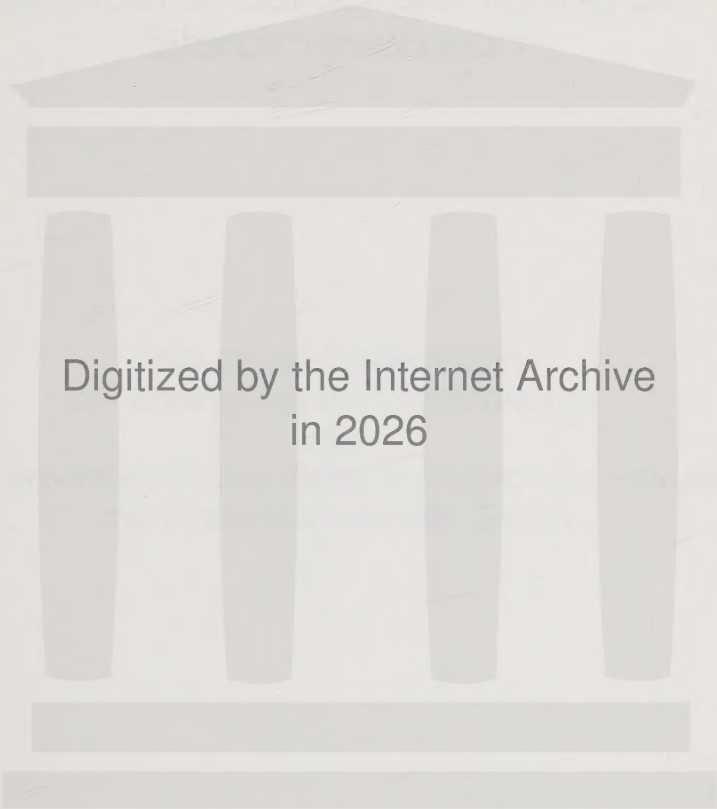
Untersuchungen zur enteralen Resorption von Pharmaka in Abhängigkeit von Molekülstruktur und galenisch-technologischen Hilfsmitteln unter besonderer Berücksichtigung der Steroidresorption

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jan Gerhard Hart
aus Pressburg

Berlin 1967

1960


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0064

Untersuchungen zur enteralen Resorption von Pharmaka in Abhängigkeit von Molekülstruktur und galenisch-technologischen Hilfsmitteln unter besonderer Berücksichtigung der Steroidresorption

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jan Gerhard Hart
aus Pressburg

Berlin 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Schenck
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung : 2o.12.1967

Tag der Promotion : 4. Mrz. 1968

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. S c h e n k im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und im Hauptlaboratorium der Schering AG., Berlin, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. S c h e n k und Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. E. G e r h a r d s danke ich für wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Herrn Direktor Dr. H. G i b i a n (Leiter der pharmazeutisch-chemischen Forschung der Schering AG., Berlin) danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 1. Einführung und Problemstellung.

3 2. Das Resorptionsmodell.

4 2.1. Das Rattencäcum als Resorptionsmodell.

4 2.2. Nachweis der Gleichwertigkeit der Membran des Cäcums und des Dünndarmes hinsichtlich ihres Resorptionsverhaltens.

7 2.3. Nachweis von Mucosaprotein in Cäcum und Dünndarm der Ratte.

8 2.4. Esteraseaktivität des Mucosaproteins.

9 2.5. Leistungsfähigkeit des Resorptionsmodells.

9 2.5.1. Lösungsgeschwindigkeit-Resorptionsgeschwindigkeit.

1o 2.5.2 Non ionic diffusion im Cäcummodell.

11 3. Die Kinetik von Resorptionsvorgängen im Rattencäcum.

11 3.1. Der Resorptionsvorgang.

12 3.2. Nachweis der Gültigkeit des Fickschen Diffusionsgesetzes für die Resorption von Steroiden aus dem Rattencäcum.

14 3.3. Membranpermeationskonstante K_{perm}

16 3.4. Nachweis des aktiven Transportes im Cäcummodell.

18 4. Das Resorptionsverhalten von Steroiden.

18 4.1. Kinetik.

2o 4.2. Steroidresorption.

27 4.3. Steroidester-Resorption

33 5. Zur Möglichkeit,die Membranpermeation zu beeinflussen.

33 5.1. Biologische Membranen.

34 5.2. Der Einfluss von Tensiden und Komplexon III auf die Membranpermeation.

35 5.3. Der Einfluss von Gallensäuren und nativer Rattengalle auf die Membranpermeation.

36 6. Zum Mechanismus der Resorptionssteigerung in der Cäcummembran.

36 6.1. Grenzflächenproblem?

37 6.2. Verdrängung von Pharmaka aus einer Eiweissbindung an der Mucosa des Rattencäcums?

38 6.3. Diskussion der möglichen Vorgänge.

4o 7. Zur Membranpermeation im alloxandiabetischen Zustand.

43 8. Diskussion

48 9. Experimenteller Teil.

48 9.1.Die Bestimmung des nicht resorbierten Anteils von Pharmaka aus dem Dünndarm und Cäcum der Ratte.

48 9.2.Vorbereitung der Tiere.

48 9.2.1.Resorptionsversuche am Dünndarm der Ratte.

49 9.2.2.Resorptionsversuche am Rattencäcum.

5o 9.3. Resorptionsuntersuchungen am isolierten Rattendünndarm.

5o 9.3.1.Präparation des Rattendünndarmes,'everted sac' Methode

51 9.3.2.Nachweis des aktiven Transportes von Steroiden am 'everted sac'.

52 9.3.3.Untersuchung der Esterresorption am 'everted sac'.

52 9.4.Experimentelle Erzeugung eines Alloxandiabetes.

53 9.5.Gewinnung von Mucosaprotein.

54 9.6.Elektrophorese von Mucosaprotein.

54 9.7.Esteraseaktivität des Mucosaproteins.

55 9.8.Spaltungsgeschwindigkeit von Steroidestern durch Mucosaprotein.

56 9.9.Bestimmung der Eiweissbindung von Steroiden.

56 9.lo. Analytik.

56 9.lo.1.Extraktion.

57 9.lo.2.Quantitative Bestimmung.

58 9.lo.3.Messung der Radioaktivität.

58 9.11.Verwendete Substanzen und Lösungen.

62. lo. Zusammenfassung.

64 11. Literatur.

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Unter den Applikationsformen eines Pharmakons dominieren diejenigen für den oralen Gebrauch. Oral verabreicht erfolgt bei der Passage des Magen-Darm-Traktes fortlaufend der Übertritt des Pharmakons in das Lymph- und Gefäßsystem. Die Geschwindigkeit, mit der solche Vorgänge ablaufen, ist einerseits bestimmt durch das Pharmakon und dessen Arzneiform, andererseits durch das biologische System. Im allgemeinen bestimmt die Resorptionshöhe Ausmaß und Dauer der biologischen Wirkung.

Innerhalb gewisser Grenzen können einzelne, für die Resorption wirksam werdende Faktoren gesteuert werden.

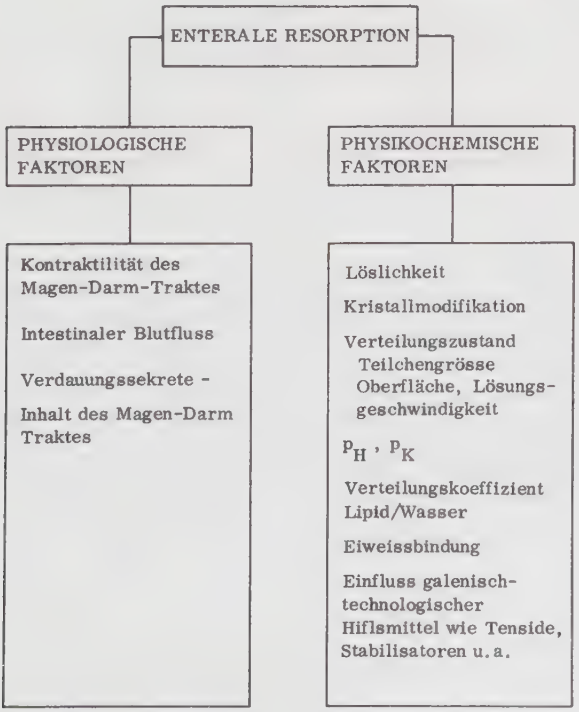


Abb. 1

Die Entwicklung optimaler Darreichungsformen und Dosierungsschemata setzt die Prüfung am biologischen System voraus. In der Regel sind solche Versuche aufwendig, sowohl an Zeit als auch an Material. Industrielles Screening verlangt jedoch rasche und präzise Information. Hierfür sind eine Reihe von Modellsystemen zu Studium der enteralen Resorption herangezogen worden.

Betrachtet man den Resorptionsvorgang als Membranpermeation, so kann man die Bedingungen untersuchen, unter denen ein Pharmakon eine Membran passiert. Synthetische Membranen [1,2,41], trotz befriedigender technischer Lösungen, sind hierbei abzulehnen, da bisher überzeugende Aussagen nur am biologischen Modell erhalten werden konnten. Insbesondere die Wechselwirkung Membran/Pharmakon bzw. Membran/galenisch-technologischer Hilfsstoff u.a. zwingt zum biologischen Modell, da sonst weder über die Membranbeeinflussung noch über die Art des durch die Membran erfolgten Stofftransportes exakte Aussagen gemacht werden können.

Der Aufbau biologischer Membranen [3,4] sowie die Prinzipien, nach denen ein Stofftransport durch sie hindurch erfolgt, sind bekannt [5-8].

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe eines leicht zu handhabenden biologischen Modells das Resorptionsverhalten von Steroiden untersucht werden. Insbesondere die Untersuchung der Transportkinetik, die Abhängigkeit der Membranpermeation von der Molekülstruktur sowie die Möglichkeit, die Membranpermeation zu beeinflussen, standen im Vordergrund der Arbeit.

2. DAS RESORPTIONSMODELL

Aus den in der Einleitung genannten Gründen ist es zweckmäßig, mit einem biologischen Modell zu arbeiten. Da es sich hierbei im wesentlichen um Resorptionsuntersuchungen am Dünndarm handelt, besteht die Möglichkeit, sowohl den gesamten Dünndarm (Duodenum - Ileum) wie auch einzelne Segmente in die Untersuchungen einzubeziehen.

Die Resorptionskapazität des Darmrohres ist bestimmt durch die Größe des zur Resorption befähigten Epitels. Da sich die Anzahl Kerckringscher Falten, Villi und Microvilli vom Duodenum abwärts verringern, verändert sich entsprechend die Resorptionskapazität [9-12]. In den Magen-Darm-Trakt eingegebenes gelöstes Substrat wird unter physiologischen Bedingungen bereits im oberen Jejunum fast vollständig resorbiert. Bei Resorptionsuntersuchungen ist es folglich entscheidend, daß stets gleiche Organbezirke präpariert werden können.

Methodisch haben sich zwei Verfahren bewährt, die an der narkotisierten Ratte in situ angewandt werden. Entweder perfundiert man den ganazen Darm (Duodenum - Ileum) oder auch einzelne definierte Darmabschnitte mit der Lösung des zu untersuchenden Pharmakons und ermittelt aus der Konzentrationsdifferenz zwischen eingegebener Lösung und ablaufendem Perfusat den resorbierten Anteil - unter Berücksichtigung einer ebenfalls eingetretenen Wasserresorption [13]. Oder man injiziert ein definiertes Volumen der Prüflösung und bestimmt nach Tötung des Versuchstieres und gründlichem Auswaschen des Organs den nicht resorbierten Anteil [8].

2.1 Das Rattencäcum als Resorptionsmodell

Die genannten Verfahren erlauben Aussagen nur unter Benutzung definierter Darmabschnitte und unter Verwendung von Lösungen der zu untersuchenden Pharmaka.

Das Rattencäcum ist als ein zur Resorption befähigtes Organ bekannt [14]. Es ist der Ort des bakteriellen Abbaues der Zellulose, die hier als Glukose zur Resorption gelangt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde u.a. auch versucht, ein Resorptionsmodell zu finden, mit dem Resorptionsuntersuchungen auch an Suspensionen durchgeführt werden können. Will man Suspensionen eines Pharmakons untersuchen, z.B. in Hinsicht auf die Abhängigkeit der Resorptionsgeschwindigkeit von der Teilchengröße, so ist man gezwungen, eine analytisch gut erfaßbare Menge der Suspension zu applizieren. Das Organ muß einer Probennahme leicht zugängig und die Resorptionsverhältnisse müssen stets reproduzierbar sein.
Diese Eigenschaft weist das Cäcum der Ratte auf. Einen besonderen Vorteil stellt daneben die einfache Präparation des Organs in situ dar, die nach Laparatomie mittels eines 2 bis 3 cm breiten Schnittes in das untere Abdomen erfolgt.

2.2 Nachweis der Gleichwertigkeit der Membran des Cäcums und des Dünndarmes hinsichtlich ihres Resorptionsverhaltens*

Phylogenetisch leitet sich das Cäcum vom Darmrohr ab [15, 16]. Daher ist zu erwarten, daß die Cäcummembran in ihren Resorptionseigenschaften der Membran des Dünndarmes entspricht. Unterschiede zeigen sich jedoch in der Resorptionskapazität der beiden Organe. Sie sind einerseits

---

* Wenn nicht anders angegeben, verstehen sich die Resorptionsangaben in den Tabellen und Abbildungen in % resorbiert pro Zeit (30 Min.).

bedingt durch die unterschiedliche Organgröße, zum anderen durch die unterschiedliche Größe des zur Resorption befähigten Epithels.
Der Nachweis der Gleichwertigkeit erfolgte in der Weise, daß von Stoffpaaren aus unterschiedlichen Stoffklassen die Zeitabhängigkeit des Resorptionsvorganges verfolgt wurde (Abb.2 und 3).

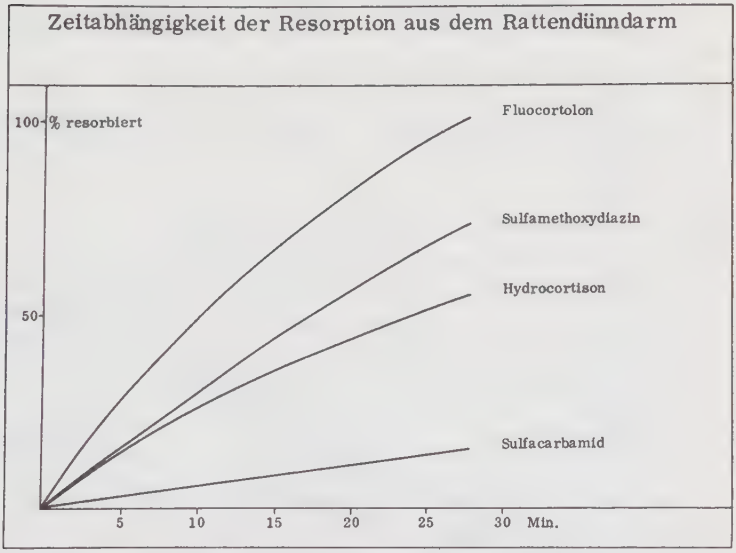


Abb. 2

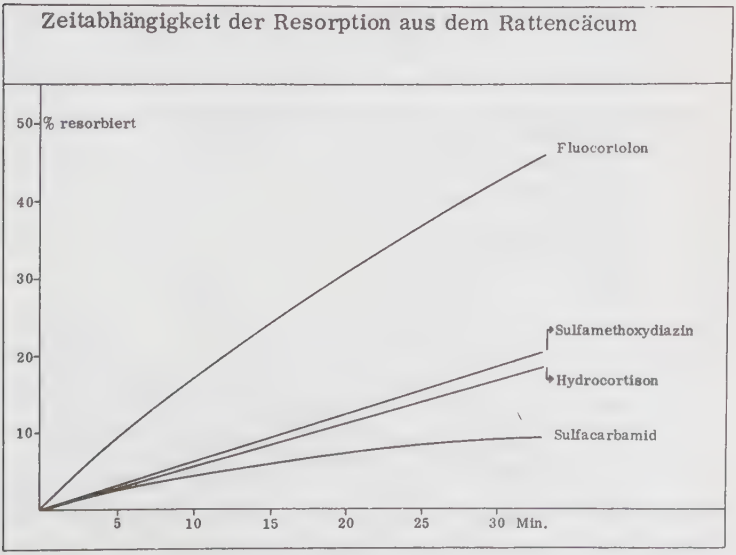


Abb. 3

Aus der graphischen Darstellung wird dann der Bereich ersichtlich, in dem die Resorptionsrate der Zeit proportional ist, d.h. der Resorptionsvorgang mit maximaler Geschwindigkeit abläuft.
Verfolgt man jetzt die Substratabhängigkeit des Resorptionsvorganges bei einer Zeit, die im linearen Bereich liegt, so erhält man Geraden (Abb. 4 und 5).

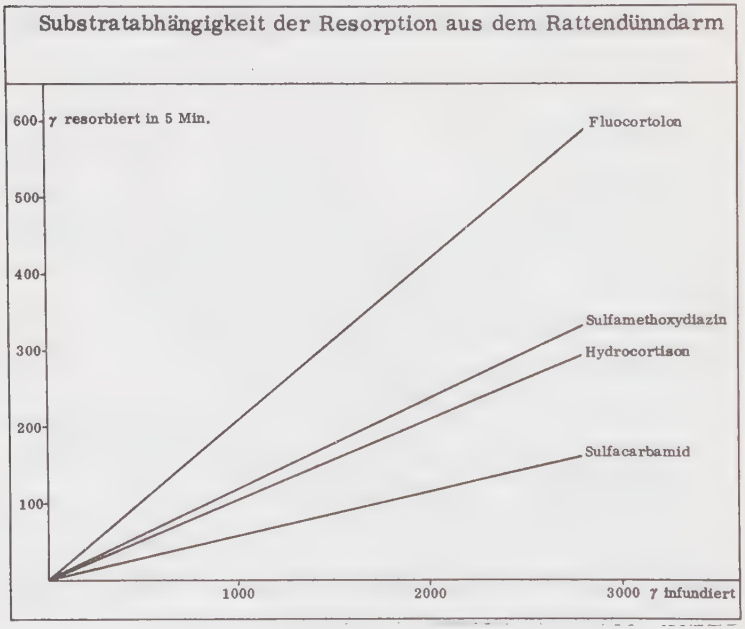


Abb. 4

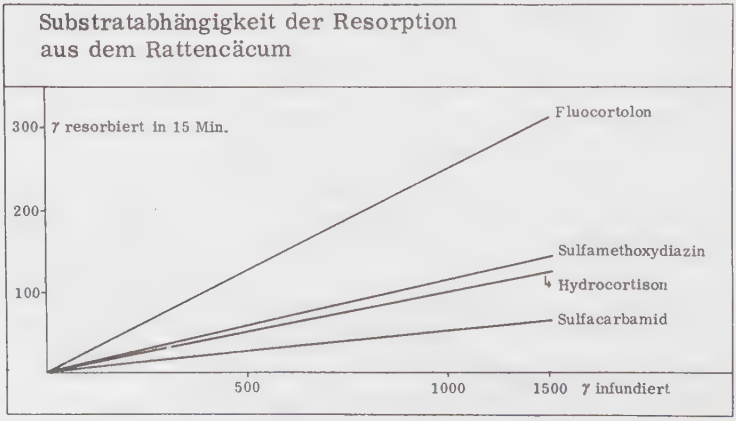


Abb. 5

Das Verhältnis der Anstiege dieser Geraden der jeweiligen Stoffpaare ist in Cäcum und Dünndarm konstant.
Für das Stoffpaar Sulfamethoxydiazin/Sulfacarbamid beträgt das Verhältnis in Cäcum und Dünndarm 2 : 1, für das Stoffpaar Fluocortolon/Hydrocortison 2,25 : 1.
Cäcum- und Dünndarmmembran zeigen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen gleiche Resorptionseigenschaften.

2.3 Nachweis von 'Mucosaprotein' in Cäcum und Dünndarm der Ratte.

Befreit man Dünndarm und Cäcum durch vorsichtiges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung von den in ihnen enthaltenen Nahrungsstoffen und gibt ein Volumen von 10 bzw. 5 ml physiologischer Kochsalzlösung in das Lumen ein, so wird aus der Darmwand eine Substanz in das Lumen abgegeben, die mit Trichloressigsäure und Uranylazetat fällbar ist. Gibt man z.B. 5 ml physiologischer Kochsalzlösung in das Cäcum ein, so resultiert nach 30 Min. eine Lösung, die nach Lowry bestimmt etwa 170 mg% Eiweiß enthält. Im folgenden wird diese Lösung als Mucosaprotein bezeichnet.

Das Mucosaprotein läßt sich durch Elektrophorese auf Azetatfolie in Veronalpuffer von pH 8.6 in 3 Zonen auftrennen, die anodisch wandern. Mucosaprotein aus Rattencäcum und Rattendünndarm verhält sich elektrophoretisch gleich.

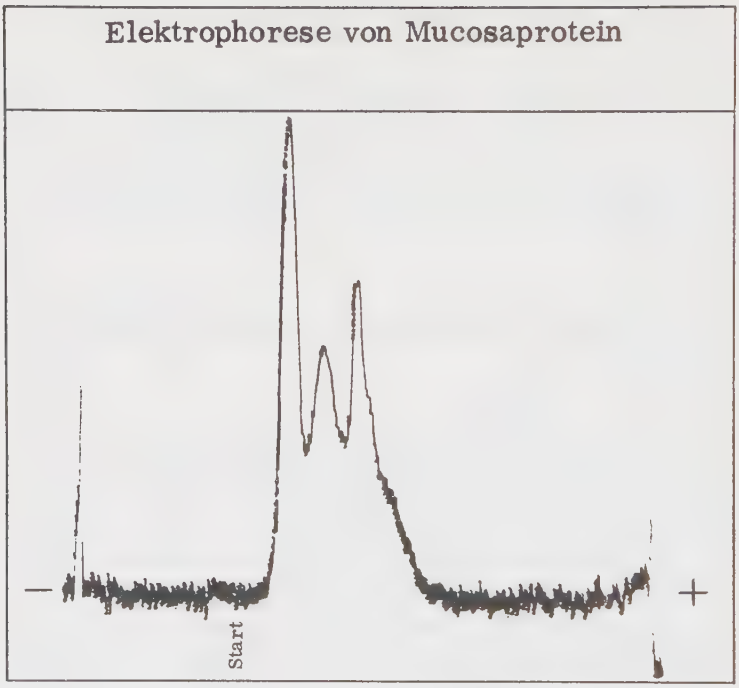


Abb. 6

2.4 Esteraseaktivität des Mucosaproteins

Inkubiert man Steroidester bzw. Triglyceride mit Mucosaprotein bei 37 °C, so erfolgt eine Spaltung der Ester. Mucosaprotein aus Cäcum und Dünndarm besitzt Esteraseaktivität.

2.5 Leistungsfähigkeit des Resorptionsmodells

2.5.1 Lösungsgeschwindigkeit - Resorptionsgeschwindigkeit

Für eine hohe Resorptionsgeschwindigkeit ist eine ausreichende Löslichkeit des Pharmakons mitentscheidend. Da die meisten Pharmaka jedoch relativ schlecht löslich sind, wird nicht die absolute Löslichkeit sondern die von der Teilchenoberfläche bzw. Teilchengröße abhängige Lösungsgeschwindigkeit bestimmend für den Resorptionsverlauf [17,18].

Am Cäcummodell läßt sich der Einfluß der Lösungsgeschwindigkeit auf die Resorptionsgeschwindigkeit gut verfolgen, wobei durch einfache Probenentnahme über die ganze Versuchsdauer auch Untersuchungen über eintretende Veränderungen der suspendierten Partikel (Kristallwachstum, Agglomeratbildung, Änderung der Kristallmodifikation ect.) alleine oder in Abhängigkeit von galenisch-technologischen Hilfsmitteln durchgeführt werden können.

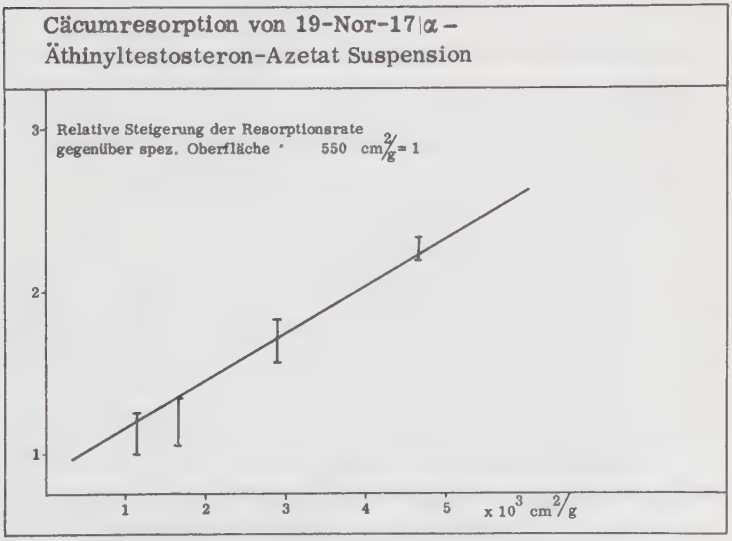


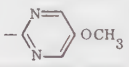
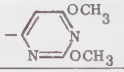
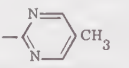
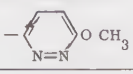
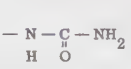
Abb. 7

2.5.2 Non ionic diffusion im Cäcummodell

Bei der Resorption schwacher Elektrolyte wird die Resorptionsgeschwindigkeit bestimmt durch den jeweils vorliegenden nicht ionisierten und somit lipidlöslicheren Anteil des Elektrolyten [19,31].
Die pH-Abhängigkeit des Verhältnisses von ionisiertem zu nicht ionisiertem Anteil eines schwachen Elektrolyten wird durch die Henderson-Hasselbach-Gleichung ausgedrückt Nach Untersuchungen von Brodie [20] herrscht an der Mucosa des Darmrohres ein pH-Wert von 5,3. Somit ist das Verhältnis von ionisiertem zu nicht ionisiertem Anteil durch diesen pH bestimmt.

Aus Tab. 1 wird ersichtlich, daß die angeführten Sulfonamide deutliche Abhängigkeit ihrer Resorptionsraten vom Dissoziationsgrad und dem Lipid-Verteilungskoeffizienten Chloroform/Wasser zeigen.

Sulfonamidresorption aus dem Rattencäcum

Generic name	R	P_K	% nicht ionisiert bei p_H 5.3	Verteilungskoeffizient $CHCl_3$/ Phosphatpuffer P_H 5.3	% resorbiert in 30 Min.
Sulfanilamid	H	10.3	~100 %	0.06	27
Sulfamethoxydiazin		7.02	98 %	8	18
Sulfadimethoxin		6.3	92	24	16
Sulfamerazin		7	98	2.5	14
Sulfamethoxypyridazin		7	98	2.4	14
Sulfacarbamid		5.4	56	0.045	9

Tab. 1

3. DIE KINETIK VON RESORPTIONSVORGÄNGEN IM RATTENCÄCUM

3.1 Der Resorptionsvorgang

Die Resorption eines Pharmakons aus dem Magen-Darm-Trakt stellt den Übergang dieses Stoffes aus dem Darmlumen in den Kreislauf dar. Bei diesem Transport werden eine Reihe von Membranen passiert. Zunächst dringt das Pharmakon durch die Epithezellmembran in die Epithelzelle ein, verläßt sie wieder durch eine Membran, glangt durch die Basalmembran an die bindegewebige Lamina propria und von dort durch weitere Membranen an die Kapillaren und wird entweder mit dem Blutstrom über die vena portae oder mit der Lymphe über den ductus thoracicus abtransportiert.

Im vorliegenden Resorptionsmodell wird die Pharmakonmenge als resorbiert betrachtet, die nach Versuchsende als Differenz zwischen injizierter Menge und nicht resorbiert zurückbleibender erhalten wird.

Wenn man bei Resorptionsuntersuchungen den Meßdaten eine kinetische Grundlage geben will, so kann man von einer vereinfachten Modellvorstellung ausgehen. Man betrachtet den Resorptionsvorgang als einen Prozess des Stoffaustausches in einem 2-compartment-System. In diesem Modell wird der gesamte Gewebskomplex, den das Pharmakon bei seinem Transport vom Lumen bis in die Kapillaren durchdringt, zu einer Membran zusammengefaßt. Tatsächlich liegt jedoch ein Multicompartment-System vor, da der durchdrungene Gewebskomplex sich in eine Reihe von Einzelcompartments aufgliedern läßt.

Unter der Voraussetzung des gleichartigen Aufbaues biologischer Membranen nach dem u n i t m e m b r a n e c o n c e p t [4] genügt dieses Modell zur kinetischen Behandlung des Resorptionsvorganges, da das Eindringen

des Pharmakons in die Epithelzelle durch die Epithelzellmembran der erste, und offensichtlich geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

3.2 Nachweis der Gültigkeit des Fick'schen Diffusionsgesetzes für die Resorption von Steroiden aus dem Rattencäcum.

Die Resorption der meisten Pharmaka erfolgt durch Diffusion [21], seltener durch spezialisierte Transportprozesse [22,23]. Geht man von den zur Zeit geltenden Vorstellungen des Aufbaues biologischer Membranen aus [3,4], so handelt es sich im wesentlichen um Diffusionsprozesse durch Lipoproteidmembranen bzw. Membranporen. Die Permeationsgeschwindigkeit wird hierbei, soweit es sich um organische Nichtelektrolyte handelt, durch die Lipidlöslichkeit, d.h. einen Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser mitbestimmt, bei schwachen organischen Elektrolyten durch den pH-abhängigen Dissoziationsgrad gemäß der Hypothese der non ionic diffusion. Niedermolekulare, hydrophile Stoffe permeieren durch Membranporen, soweit nicht ein spezialisiertes Transportsystem auftritt [24].

Diffusionsvorgänge werden durch die Fick'schen Diffusionsgesetze beschrieben [25]. Für die Behandlung des Membrantransportes findet das 1. Fick'sche Gesetz Anwendung. Es macht eine Aussage über den inder Zeiteinheit durch eine Grenzfläche erfolgten Stofftransport. Hierbei ist die diffundierende Stoffmenge proportional dem Diffusionskoeffizienten D, dem Querschnitt q (Resorptionsfläche) und dem in der Grenzschicht herrschenden Konzentrationsgefälle dc/dx.

$$-\frac{dn}{dt} = D \cdot q \cdot \frac{dc}{dx} \qquad (1)$$

Den Ausdruck für das Konzentrationsgefälle kann man wie folgt vereinfachen. Setzt man für dc die Differenz der Konzentrationen an Pharmakon beider compartments (c_L-c_P), so gilt:

$$-\frac{dn}{dt} = D \cdot q \cdot \frac{c_L - c_P}{dx} \qquad (2)$$

c_L = compartment 1 = Lumen
c_P = compartment 2 = Plasma

Da die Konzentration im Plasma (durch Verteilung im Organismus, Speicherung, Ausscheidung ect.) gegenüber der Konzentration im Lumen sehr klein wird, sodaß eine Rückdiffusion aus dem Plasma in das Lumen zu vernachlässigen ist, kann man $c_P = 0$ setzen.
Dadurch geht Gleichung (2) über in:

$$-\frac{dn}{dt} = D \cdot q \cdot \frac{c_L}{dx} \qquad (3)$$

Im Experiment sind D (bei Pharmaka vergleichbarer Molekülgröße), q (Membranfläche) und dx (Membrandicke) durch das Nodell bestimmt und damit konstant, sodaß $\frac{D \cdot q}{dx}$ zu einer neuen Konstante zusammengefaßt werden können:

$$-\frac{dn}{dt} = \frac{D \cdot q}{dx} \cdot c_L \qquad (4)$$

$$-\frac{dn}{dt} = K \cdot c_L \qquad (5)$$

Daraus folgt, daß der durch Diffusion erfolgende Stofftransport proportional der Konzentration im Lumen ist. Trägt man bei konstanter Resorptionszeit die Konzentration im Lumen gegen den bei der jeweiligen Konzentration resorbierten Anteil auf, so erhält man Geraden.

Es wurde gefunden, daß innerhalb der durch die Löslichkeit gesetzten Grenzen die untersuchten Sulfonamide und Steroide der Gleichung (5) gehorchen. (Abb. 4 und 5)

3.3 Membranpermeationskonstante K_{perm}

Verfolgt man die Cäcumresorption von Steroiden oder Sulfonamiden, indem man graphisch den jeweils zur Zeit t nicht resorbierten Anteil gegen die Zeit aufträgt, so werden exponentiell abfallende Kurvenzüge erhalten. Bei semilogarithmischer Darstellung ergeben sich folgende Geraden (Abb. 8 und 9).

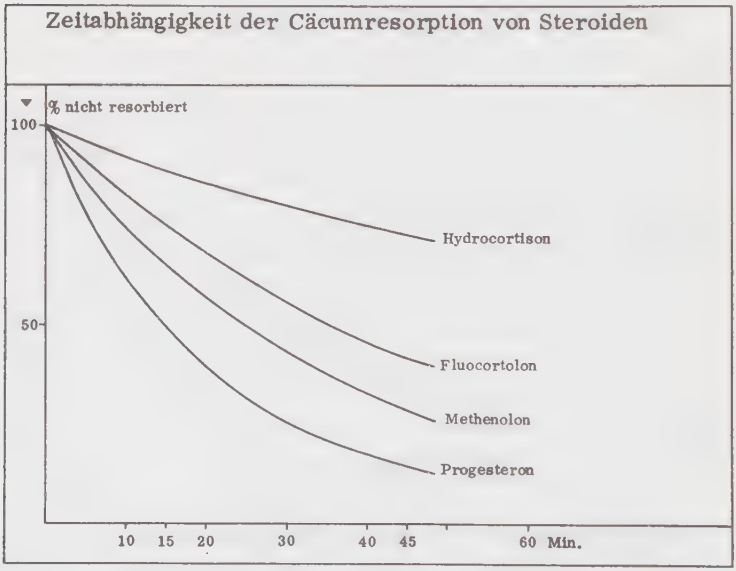


Abb. 8

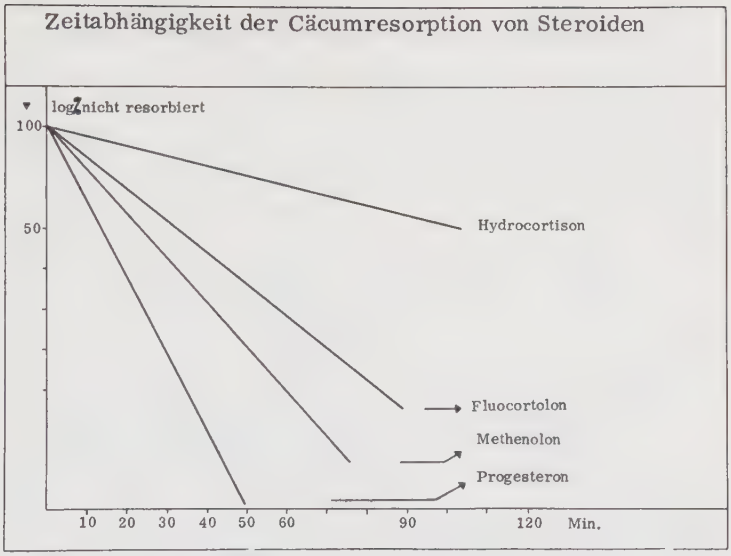


Abb. 9

Soweit es sich um aufgrund von Diffusion permeierende Stoffe handelt, läßt sich der Resorptionsvorgang formal als Reaktion 1. Ordnung behandeln [25,26].

Als Differentialansatz ergibt sich, wenn c die Konzentration des nicht resorbierten Pharmakons zur Zeit t und K die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung darstellt:

$$-\frac{dc}{dt} = K \cdot c \qquad (1)$$

Integriert man über die Grenzen der Pharmakonkonzentration c_o bei der Zeit t_o und c bei t, so gibt nach Logarithmierung, Umformung von ln in log und Auflösung nach K:

$$\int_{c_o}^{c} \frac{dc}{c} = -K \int_{t_o}^{t} dt \qquad (2)$$

$$\ln c - \ln c_o = -K (t - t_o) \qquad (3)$$

$$\ln c - \ln c_o = -K t \qquad (4)$$

$$\log c - \log c_o = -\frac{K t}{2.303} \qquad (5)$$

$$K = \frac{2.303}{t} \cdot \log \frac{c_o}{c} \qquad (6)$$

K stellt ein Maß für die Permeationsgeschwindigkeit des betreffenden Pharmakons dar.

3.4 Nachweis des aktiven Transportes im Cäcummodell

Der größte Teil der Pharmaka passiert biologische Membranen durch Diffusion, wobei der Transport keine Selektivität aufweist.
Man deutet die Spezifität mancher Transportvorgänge durch Annahme besonderer spezialisierter Transportsysteme, die in der Membran lokalisiert sein sollen. Man glaubt, daß das Pharmakon an ein Enzym = Carrier gebunden durch die Zellmembran transportiert wird. Für Hexosen, Aminosäuren, Herzglykoside, Na^+ u.a. sind solche Vorgänge belegt [23, 27,28].

Die Kriterien des durch einen Carrier vermittelten Transportes sind nach Kruhøffer [24]:

a. Substrat- und Richtungsspezifität
b. Transport gegen einen Konzentrationsgradienten
c. Sättigung bei genügend hohen Substratkonzentrationen
d. Abhängigkeit von der energieliefernden Reaktion und Hemmbarkeit durch Stoffwechselgifte wie CN^-, F^-, Jodazetat u.a.
e. Kompetitive Hemmung bei ähnlichen Substraten

Für die kinetische Behandlung des Carrier-Transportes lassen sich formal die aus der Enzymkinetik abgeleiteten Gesetze anwenden. Hierbei stellt der Carrier das Enzym, das Pharmakon das Substrat dar.

Führt man in die Michaelis-Menten - Gleichung für die Michaelis-Konstante K_M die Affinitätskonstante Substrat/Carrier K_C ein, so folgt:

$$- \frac{dn}{dt} = \frac{\frac{dn}{dt}_{max} \cdot [s]}{K_C + [s]}$$

a. Für den Fall, daß K_C sehr viel größer als die Substratkonzentration [s] ist, folgt, daß K_C + [s] näherungsweise K_C bleibt.

Faßt man (v_{max}) d.h. $\frac{dn}{dt}_{max}$ und K_C (die für ein definiertes Substrat konstant sind) zu einer neuen Konstante K zusammen, so ergibt sich, daß die Resorptionsgeschwindigkeit der Substratkonzentration proportional wird:

$$- \frac{dn}{dt} = \frac{\frac{dn}{dt}_{max} \cdot [s]}{K_C} = K \cdot [s]$$

b. Für den Fall, daß [s] gegenüber K_C sehr groß wird (d.h. bei sehr hohen Substratkonzentrationen) bleibt K_C + [s] näherungsweise [s], woraus folgt, daß die Resorption mit konstanter Geschwindigkeit abläuft.

Es konnte am Cäcummodell gezeigt werden, daß der Glukosetransport einem solchen Mechanismus gehorcht (Abb. 10).

Bei Steroiden konnte eine Substratsättigung wegen der geringen Löslichkeit dieser Verbindungen nicht erzielt werden.

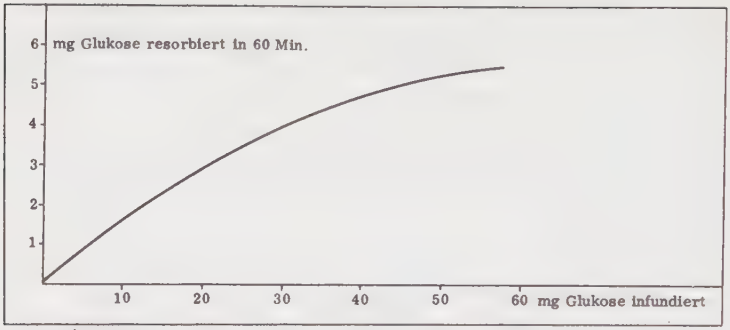


Abb. 10

4. DAS RESORPTIONSVERHALTEN VON STEROIDEN

4.1 Kinetik

Die in den Tabellen 2 - 8 aufgeführten Steroide gehorchen (innerhalb der durch die geringe Löslichkeit gesetzten Grenzen) dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz. Die Resorptionsgeschwindigkeit wird durch die Lipidlöslichkeit bestimmt, wie im folgenden Abschnitt 4.2 noch diskutiert wird.

Bei zwei Steroiden läßt sich das Resorptionsverhalten durch Diffusionsvorgänge allein nicht genügend beschreiben. Wird das Resorptionsverhalten von Testosteron und Östradiol im Cäcummodell in Gegenwart von Stoffwechselinhibitoren (10^{-3}molar NaCN, NaF, 2.5-Dinitrophenol) untersucht, so beobachtet man eine ausgeprägte Erniedrigung der Resorptionsraten. Läge nur reine Diffusion vor, so dürfte keine Änderung der Resorptionsrate eintreten [23].

Es wurde daher vermutet, daß die Membranpassage von Östradiol und Testosteron durch ein spezialisiertes Transportsystem erfolgt. Ein weiterer Hinweis auf einen solchen Vorgang stellt die Tatsache dar, daß Testosteronazetat und Östradiolvalerianat trotz besserer Lipidlöslichkeit geringere Resorptionsraten aufweisen als die Stammverbindungen.

Ein Kriterium eines aktiven Transportes stellt unter anderem die Möglichkeit der Sättigung des Transportsystems dar. Da wegen der geringen Löslichkeit der Steroide eine Substratsättigung nicht zu erreichen war, wurde mit Hilfe der e v e r t e d s a c Methode in einer Modifikation des Wilson-Wiseman Verfahrens [29] eine Zeitabhängigkeit des Transportes von der Mucosa- zur Serosaseite aufgenommen. Zu erwarten war, daß die durch Diffusion permeierenden Steroide einem Gleichgewichtszustand zustreben, in dem der Quotient aus Konzentration des Serosamediums / Konzentration des Mucosamediums sich 1 nähert.

Bei aktiv transportierten Verbindungen wird ein Konzentrationsgradient errichtet und es kommt nicht zur Gleichgewichtseinstellung. Der Quotient aus Serosa- / Mucosakonzentration übersteigt hierbei den Faktor 1 erheblich.

Von den untersuchten Steroiden zeigten nur Östradiol und Testosteron dieses Verhalten (Abb. 11).

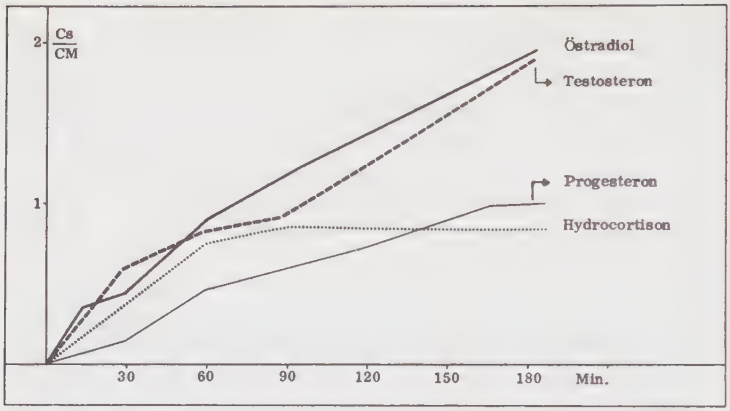


Abb. 11 gibt das Verhalten des Quotienten der Radioaktivität* gleicher Volumina von Serosa- / Mucosamedium gegen die Zeit wieder. C_S = Aktivität des Serosamediums, C_M = Aktivität des Mucosamediums.

4.2 Steroidresorption

Die Resorption von Steroiden erfolgt überwiegend durch Membrandiffusion. Bei aktiv transportierten Steroiden erfolgt weder durch ebenfalls aktiv transportierte, noch durch Diffusion transportierte Steroide eine Beeinflussung der Resorptionsrate [30].
Die Resorptionsrate aus isotonischer Kochsalzlösung ist bestimmt durch die Lipidlöslichkeit der einzelnen Steroide. Mit steigender Anzahl polarer Gruppen im Molekül sinkt entsprechend die Resorptionsrate (Tab. 2 - 10).

---

* Herrn Dr. P.E.Schulze, Radioisotopenabteilung der Schering AG., Berlin, danke ich für die Synthese radioaktiv markierter Verbindungen.

Äthinylsteroide stellen sehr schwache Säuren dar, sodaß selbst aus gepufferten Lösungen pH 8 keine Beeinflussung der Resorptionsrate zu erkennen ist.

Steroidhemisulfate zeigen einen Äquivalenz-pH von 7 [32], sind somit so stark dissoziiert wie verd. Schwefelsäure und entsprechend besitzen sie eine niedrige Resorptionsrate.

Die verschiedenen Hemisulfate verhalten sich hinsichtlich ihrer Membranpermeation gleich. Die unterschiedliche Polarität der einzelnen Stammverbindungen macht sich hierbei nicht bemerkbar.

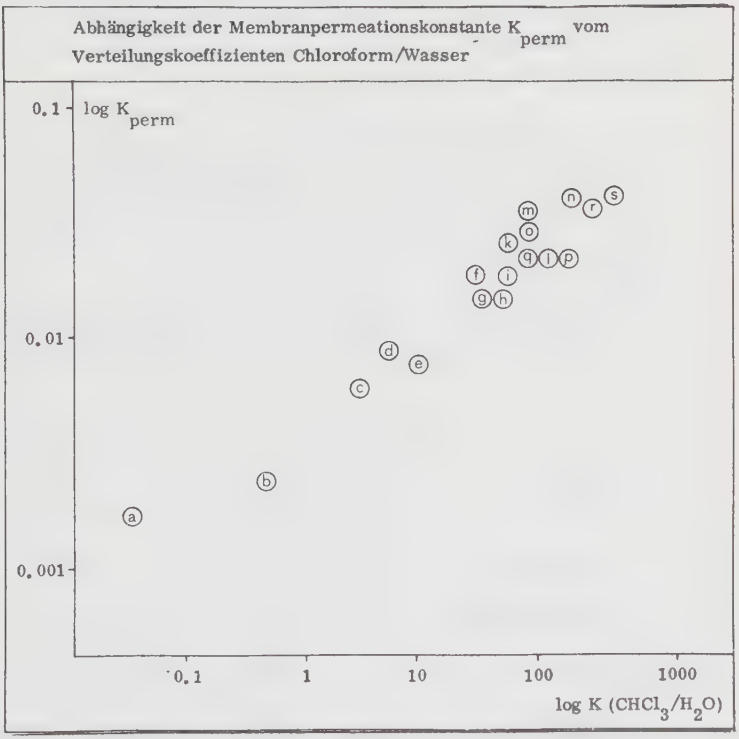


Abb. 12

a=Hemisulfate von Fluocortolon, Hydrocortison, Testosteron, b=Triamcinolon, c=Hydrocortison, Prednisolon, d=Fluorhydrocortison, e=Dexamethason, f=Cortison, g=Hydrocortisonazetat, h=Triamcinolonazetonid, i=Fluocortolon, k=Metenolonazetat, l=Metenolon, m=Testosteronazetat, n=Progesteron, o=Cyproteron, p=Cortisonazetat, q=Östron, r=19-Nor-17-hydroxyprogesteron, s=Testosteronpropionat. (Chem.Bezeichnung der Verbindungen s.Tab.4-10)

Es wurde gefunden, daß eine Relation zwischen dem Verteilungskoeffizienten Chloroform/Wasser und der Membranpermeationskonstanten K_{perm} besteht. Aus Abb. 12 (bei doppelt logarithmischer Darstellung von K_{perm} gegen $K_{Chloroform/Wasser}$) wird die Abhängigkeit der Membranpermeationskonstanten von der Lipidlöslichkeit erkennbar.

Wenn man den Verteilungsvorgang an den Membranlipiden bei der Membranpassage auch nicht ohne weiteres mit dem Verteilungskoeffizienten Chloroform/Wasser gleichsetzen kann, so hat man doch in guter Näherung eine Möglichkeit, aus dem Verteilungskoeffizienten eine gewisse Vorhersage über das wahrscheinliche Resorptionsverhalten eines Steroides zu machen, sofern der Transport allein durch Membrandiffusion erfolgt.

Die Permeationsgeschwindigkeit eines Steroides kann durch Wahl eines geeigneten Derivates gesteuert werden. Blockiert man z.B. polare Gruppen durch Veresterung mit Fettsäuren oder durch Azetonidbildung, so steigt die Resorptionsrate entsprechend der Erhöhung der Lipidlöslichkeit.

Tab. 2 gibt die Steigerung der Resorptionsrate einiger Steroidazetate gegenüber den Stammverbindungen wieder.

Steroid	freie Verbindung	Azetat
Hydrocortison	16 %	36 %
Fluorhydrocortison	20 %	40 %
Cortison	30 %	49 %
Methenolon	53 %	63 %
Cyproteron	58 %	68 %

Tab. 2

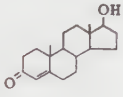
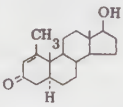
Beim Triamcinolon (7 %) steigt die Resorptionsrate durch Azetonidbildung (35 %) sogar um den Faktor 5 an.

Sofern die Spaltungsgeschwindigkeit der Steroidester im Cäcum geringer ist als die Permeationsgeschwindigkeit, gilt allgemein, daß mit steigender Kettenlänge der Fettsäure die Resorptionsrate zunimmt.
Durch Einführung weiterer polarer Gruppen, etwa in Form der Hemisulfatbildung, kann die Resorptionsrate verringert werden.

Am Beispiel des Hydrocortisons läßt sich zeigen, daß die Permeationskonstante fast über eine Zehnerpotenz hinweg variiert werden kann (Tab. 3).

	K_{perm}
Hydrocortison 21-Hemisulfat	0.00168
Hydrocortison Alkohol	0.0058
Hydrocortison 21-Azetat	0.0149

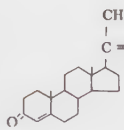
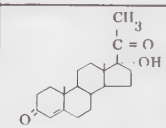
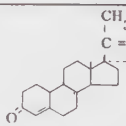
Androstan Reihe

Generic name		% resorbiert in 30 Min.	K_{perm}	Verteilungskoeffizient CH Cl_3/H_2O	* Versuche
Testosteron 17 ß -Hydroxy-4-androsten-3-on		64		100	1, 2, 3(12)
" Azetat		49	0.0224	110	2 (12)
" Propionat		72	0.0424	400	2 (6)
" Hemisulfat Na		5	0.00168	0.025	2 (9)
Methenolon 17 ß-Hydroxy-1-methyl-5 α -androst-1-en-3-on		55	0.0266	60	1, 2 (7)
" Azetat		65	0.0349	85	1, 2 (5)

Tab. 4

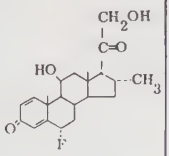
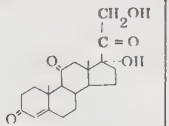
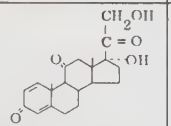
* 1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H markiertes Steroid
3 = ^{14}C markiertes Steroid
( ) Anzahl der Versuche

PREGNAN - REIHE

Generic name		% resorbiert in 30 Min	K_{perm}	Verteilungskoeffizient CH Cl_3/H_2O	* Versuche
Progesteron 4-Pregnen-3,20-dion		74	0.043	220	1.3 (7)
17-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion		67	0.037	170	1.2 (8)
17-Hydroxy-19-nor-4-pregnen-3,20-dion		68	0.038	300	1.2 (6)
" Capronat		78	0.0505	400	2 (6)

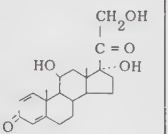
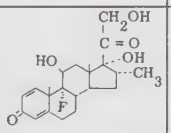
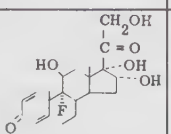
Tab. 5

* 1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H Steroid
3 = ^{14}C Steroid
( ) Anzahl der Versuche

Generic name		% resorbiert in 30 Min.	K perm	Verteilungskoeffizient CH CL_3 / H_2O	* Versuche
Fluocortolon 6α-Fluor-11 ß, 21-dihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion		42	0.0182	60	1,2 (24)
" 21 Azetat		45	0.0199	56	2 (7)
" " Butyrat		44	0.0193	125	2 (6)
" " Capronat		42	0.0182	140	2 (6)
" " Trimethylazetat		45	0.0199	185	2 (6)
" " Undecylat		46	0.0205	175	2 (6)
" " Hemisulfat Na		5	0.00168	0.03	2 (11)
Cortison 17,21- Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion		30	0.0119	35	1 (8)
" 21-Azetat		49	0.0224	150	1 (4)
Prednison 17,21-Dihydroxy-1,4-pregnadien-3,11,20-trion		25	0.00955	35	1 (6)

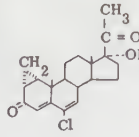
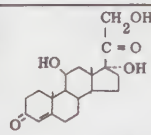
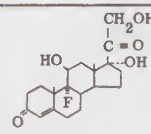
Tab. 6

* 1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H markiertes Steroid
3 = ^{14}C markiertes Steroid ( ) Anzahl der Versuche

Generic name		% resorbiert in 30 Min	K perm	Verteilungskoeffizient CH Cl_3/H_2O	* Versuche
Prednisolon 11 ß, 17,21-Trihydroxy-1,4-pregnadien-3, 20-dion		17	0.0062	4	1 (9)
" 21-Azetat		36	0.0149	45	1 (5)
Dexamethason 9-Fluor-11 ß, 17,21-trihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion		19	0.0075	10	1 (12)
Triamcinolon 9-Fluor-11 ß, 16α, 17,21-tetrahydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion		7	0.00246	0.5	1 (6)
" (16 / 17) Azetonid		35	0.0143	45	1 (5)

Tab. 7

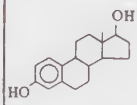
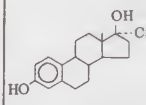
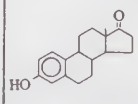
* 1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H markiertes Steroid
3 = ^{14}C markiertes Steroid
Anzahl der ( ) = Versuche

Generic name		% resorbiert in 30 Min.	K perm	Verteilungskoeffizient CH Cl_3/H_2O	* Versuche
Cyproteron 6-Chlor-17-hydroxy-1α, 2α-methylen-4,6-pregnadien-3,20-dion		58	0.0289	90	1,2 (6)
" 21-Azetat		68	0.038	245	2 (3)
Hydrocortison 11 ß, 17,21-Trihydroxy 4-pregnen-3,20-dion		16	0.0058	3	1,2 (12)
" 21- Azetat		36	0.0149	40	1,2 (9)
" " - Hemisulfat-Na		5	0.00168	0.035	2 (11)
Fluorhydrocortison 9-Fluor-11 ß, 17,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion		20	0.00765	5	1 (6)
" 21-Azetat		46	0.0205	40	1 (5)

* 1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H markiertes Steroid
3 = ^{14}C markiertes Steroid
Anzahl der ( ) = Versuche

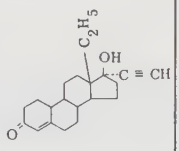
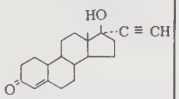
Tab. 8

OESTRAN REIHE

Generic name		% resorbiert in 30 Min.	K perm	Verteilungskoeffizient CH Cl_3/H_2O	* Versuche
Östradiol 1,3,5 (10) Östratrien-3,17 ß-diol		58		85	2 (12)
" 17-Monovalerianat		56	0.0274	105	2 (3)
Äthinylöstradiol 17α Äthinyl-1,3,5,(10) östratrien-3,17 ß - diol		59	0.0297	100	2 (6)
Östron 3-Hydroxy-1,3,5 (10) östratrien17 on		48	0.0218	95	2 (6)

* 1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H markiertes Steroid
3 = ^{14}C markiertes Steroid ( ) Anzahl der Versuche

Tab. 9

Generic name		% resorbiert in 30 Min	K_{perm}	Verteilungskoeffizient $CH\ Cl_3/H_2O$	* Versuche
Wyeth 3707 17 ß-Hydroxy-18-äthyl-17α - äthinyl-4-östren 3-on		66	0.0359	125	3 (6)
17 ß - Hydroxy-17α - äthinyl 4-östren-3-on		60	0.0305	85	1 (4)

*1 = nicht markiertes Steroid
2 = ^{3}H markiertes Steroid
3 = ^{14}C markiertes Steroid ( ) Anzahl der Versuche

Tab. 10

4.3 Steroidester - Resorption

Wird am Cäcummodell die Resorption von Steroidestern untersucht, so wird festgestellt, daß der nicht resorbierte Anteil fast vollständig gespalten ist. Da die Ester jedoch gegenüber den Stammverbindungen im allgemeinen höhere Resorptionsraten aufweisen, kann nicht gesagt werden, ob nur Ester oder Ester und Alkohol nach der Resorption im Blut auftreten [33].

Im Falle der Ester des Fluocortolons zeigen die Ester gegenüber der Stammverbindung, trotz größerer Lipidlöslichkeit, nur gering erhöhte Resorptionsraten. Es wurde daher vermutet, daß die Ester an der Cäcummucosa so schnell gespalten werden, daß die Verseifungsgeschwindigkeit der Ester für die Resorptionsgeschwindigkeit bestimmend wird.

Daher wurde zunächst die Spaltungsgeschwindigkeit verschiedener Steroidester durch Mucosaprotein untersucht. Es wurde gefunden, daß von den untersuchten Fluocortolonestern das Azetat langsamer gespalten wird als die längerkettigen Ester (Abb. 13).

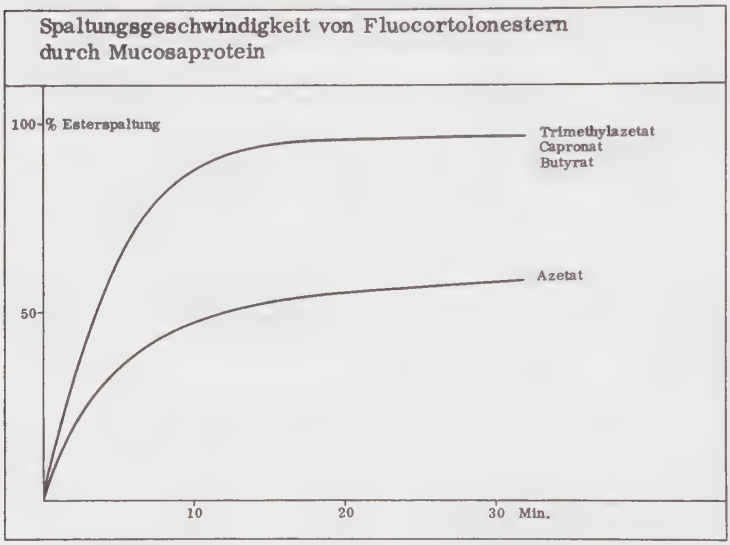


Abb. 13

Wird die Spaltungsgeschwindigkeit der Azetate von Hydrocortison, Testosteron und Fluocortolon durch Mukosaprotein untersucht, wird gefunden, daß die Azetate von Fluocortolon und Testosteron langsamer gespalten werden als Hydrocortisonazetat.
Mucosaprotein verseift Tripalmitin und Steroid-Fettsäureester. Somit ist die Esterasewirkung des Mucosaproteins als unspezifisch anzusehen.

Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen ist die Spaltungsgeschwindigkeit der Steroidester durch Mucosaprotein abhängig von der Konstitution der jeweiligen Ester.

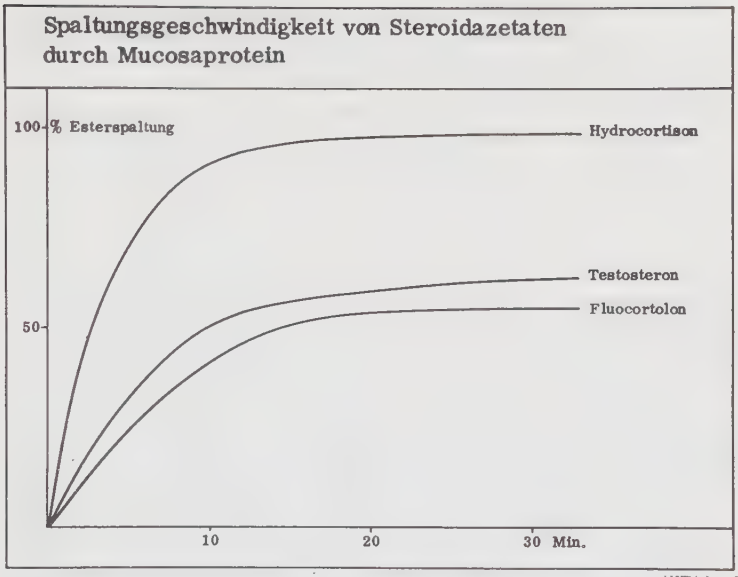


Abb. 14

Mit dem vorliegenden Resorptionsmodell ist man nicht in der Lage zu sagen, ob Steroide als Ester durch die Cäcummembran transportiert werden, denn es ist denkbar, daß nicht nur die Esterasen des Lumens, sondern eine Spaltung der Steroidester auch durch intrazellulär gelagerte Esterasen erfolgt. Eine Aussage kann nur in der Weise erfolgen, daß das Pfortaderblut untersucht wird.

Nach Untersuchungen von Gerhards [34] liegt beim Hund intraduodenal verabreichtes Metenolonazetat im Pfortaderblut zu 80-95 % als freie Verbindung vor.

Eine Aussage über den Ort der Spaltung kann nicht gemacht werden, jedoch wird aus den Ergebnissen abgeleitet, dass die Spaltung wahrscheinlich in der Darmwand vollzogen wird. Im peripheren Blut konnte kein Ester mehr nachgewiesen werden, woraus geschlossen wird, dass als Ester resorbiertes Methenolonazetat bei der Leberpassage verseift wird. Hinzu kommt, dass enteral resorbierter Steroidester durch species- und substratabhängige Serumesterasen ebenfalls gespalten werden kann. [33] [35]
Die Möglichkeit für einen Steroidester sind somit gering, nach Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt unverändert im peripheren Blut zu erscheinen.

Um zur Esterresorption eine Aussage machen zu können, wurde die 'everted sac' Methode nach Wilson-Wiseman in einer Modifizierung angewandt. Es wurde die Zeitabhängigkeit der Relation von Steroidester zu Steroidalkohol beim Transport von Mucosa zur Serosa untersucht. (siehe 7.)

Everted sac Methode : Esterresorption Zeitabhängigkeit des Quotienten Ester / Alkohol in Mucosa- und Serosamedium		
	15 Min	30 Min
Testosteronazetat	Serosa 0.58 Mucosa 0.51	Serosa 0.53 Mucosa 0.49
Hydrocortisonazetat	Serosa 0.37 Mucosa 0.17	Serosa 0.38 Mucosa 0.09
Fluocortolonazetat	Serosa 0.82 Mucosa 0.45	Serosa 0.78 Mucosa 0.47
Fluocortoloncapronat	Serosa 0.11 Mucosa 0.01	Serosa 0.09 Mucosa 0.01
Fluocortolontrimethylazetat	Serosa 0.25 Mucosa 0.01	Serosa 0.22 Mucosa 0.01

Tab.11

Es ergab sich Korrelation zwischen den Ergebnissen der Esterspaltung durch Mucosaprotein mit der Spaltung während des Resorptionsverlaufes an der Darmmucosa.
Tabelle 11 zeigt,dass während des Resorptionsverlaufes das Verhältnis Ester/Alkohol auf der Serosaseite relativ kon - stant bleibt,während auf der Mucosaseite der Ester stän - dig weiter gespalten wird.
Da das Verhältnis Ester/Alkohol über die Versuchszeit relativ konstant bleibt,kann angenommen werden,dass ein - mal in die Darmwand eingedrungener Ester dort nur noch im untergeordneten Masse gespalten wird.
Somit konnte nachgewiesen werden,dass Steroide als Ester durch die Darmwand hindurch transportiert werden können.

Eine medizinisch therapeutische Frage ist weiter,wie man den Quotienten Steroidester/Steroidalkohol beim Resorp - tionsvorgang vergrössern kann.
Wenn man ausschliesst,dass Mikrokristalle von Steroid - estern in nennenswerter Weise durch Pinocytose resorbiert werden,sollte man erwarten,dass bei Vorliegen eines Depots, aus dem ständig eine gesättigte Lösung gebildet werden kann, die Resorptionsgeschwindigkeit des Esters die Ver - seifungsgeschwindigkeit eventuell übersteigt.
Suspendiert man so viel mikronisiertes Hydrocortisonazeta bei der'everted sac'Methode im Mucosamedium,dass während der ganzen Versuchsdauer immer ungelöstes Steroidazetat vorhanden bleibt, so erreicht man eine erhebliche Ver - schiebung des Quotienten Ester/Alkohol im Serosamedium zugunsten des Esters.

Everted sac Methode:Esterresorption

	$Q\ [\frac{\text{Ester}}{\text{Alkohol}}]$ nach 3o Min.
Hydrocortisonazetat^{+} Lösung 10^{-8} mol	o.38
Hydrocortisonazetat^{++} Mikrokristalle	4

$^{+}$Hydrocortisonazetat gelöst in KHR Puffer von p_H 7.4 mit 6o mg%Glukose,bei 37^{0} begast mit einem Gasgemisch aus O_2 mit5%CO_2

Die Hemmung von Esterasen des Magen-Darm-Traktes durch Tenside ist bekannt. [36]
Somit ergibt sich eine weitere Möglichkeit, den Quotienten Steroidester/Steroidalkohol zu beeinflussen.
Es wurde gefunden, dass der Quotient Ester/Alkohol nach Zusatz von Natrium-Laurylsulfat bei der 'everted sac' Methode auf der Serosaseite ebenfalls stark zugunsten des Esters verschoben werden kann.

Everted sac Methode: Esterresorption

$Q\ [\frac{\text{Ester}}{\text{Alkohol}}]$ nach 3o Min.

	ohne Tensid*	mit o.2 % Texapon K 12**
Hydrocortisonazetat	o.38	8
Testosteronazetat	o.53	5

In Praxi könnte sich somit die Möglichkeit geben, durch Gabe von Steroidmikrokristellen unter Tensidzusatz, etwa in Form von dünndarmlöslichen Kapseln, im Darm eine relativ hohe lokale Konzentration von Steroidester zu erzeugen und gemäss oben angeführter Ergebnisse eine relativ erhöhte Resorption von Steroidester zu erreichen.
Manche Verbindungen wie z.B. Oxyprogesteroncapronat, Cholinester u.a. zeigen nur in Form ihrer Ester biologische Wirkung. Klammert man die Frage nach der Inaktivierung eines Pharmakons nach Leberpassage aus, so könnte man auf diesem Wege vielleicht von bisher parenteralen Darreichungsformen zu enteralen kommen.

++Hydrocortisonazetat Mikrokristalle 5-loμ Teilchengrösse
loo mg suspendiert in 3o ml KHR Puffer wie unter +
*Lösungen in KHR Puffer von p_H 7.4 mit 6o mg% Glukose, begast mit O_2/5 %CO_2 bei 37°
**Texapon K 12=Natrium-Laurylsulfat puriss, Dehydag Düsseldorf

5. Zur Möglichkeit,die Membranpermeation zu beeinflussen.

Von besonderem pharmazeutischen Interesse ist die Frage nach der Beeinflussung der Membranpermeation von Pharmaka. Wie bereits erwähnt, kann man durch Wahl eines geeigneten Derivates die Permeationsgeschwindigkeit variiert werden. Daneben besteht jedoch auch die Möglichkeit, durch Wahl einer geeigneten Arzneiform Einfluss auf den Resorptionsverlauf zu nehmen. Zum letzteren würde z.B. die Abhängigkeit der Resorptionsrate von der Teilchengrösse,Kristallmodifikation,galenisch technologischen Hilfsmitteln u.ä. gehören. [38,39]

5.1. Biologische Membranen.

Nach heutiger Kenntnis bauen sich biologische Membranen nach dem selben Prinzip auf. -unit membrane concept - [4] Aus elektronenoptischen Aufnahmen ist ersichtlich,dass die aus Phosphatiden,Triglyceriden und Sterinen bestehenden Membranlipide eine zentrale Mittelschicht bilden, die beiderseits von Protein umhüllt ist. [3]
Die Membranlipide sind so orientiert, dass die unpolaren Anteile zur Membranmitte gerichtet sind, während die polaren Teile die Bindung mit dem umhüllenden Protein eingehen. Die Lipidschicht selbst ist nicht homogen,sondern durch Ausbildung von Lipidmizellen befähigt, laminare und globuläre Grenzstrukturen auszubilden.
Biologische Membranen sind daher nicht statisch zu sehen, sondern als im dynamischen Gleichgewicht befindlich zu sehen.
Durch Ausbildung solcher Grenzstrukturen können sich zwischen den Lipidmizellen mit Hydratwasser gefüllte Poren bilden,die als Kanäle die Membran durchsetzen. Eingelagert in den Proteinanteil der Membranen finden sich noch Ionen wie Mg^{++} oder Ca^{++}, auf deren Bedeutung noch näher eingegangen wird.

Der Stoffaustausch durch biologische Membranen erfolgt wie bereits erwähnt,überwiegend durch Diffusion durch die Lipoiddoppelschicht,während polare Verbindungen durch Porendiffusion transportiert werden. Sofern nicht aktiver TRansport erfolgt, wird die Molekülgrösse limitierend für die Resorption polarer Substanzen. Daneben ermöglicht die Pinocytose die Passage von Festpartikeln. [4o]

5.2. Der Einfluss von Tensiden und Komplexon III auf die die Membranpermeation.

Es ist bekannt,dass Tenside [41,42] und Komplexon III [21] die Resorptionsrate von Pharmaka steigern können. Wenn auch die Angaben in der Literatur teilweise widersprechend sind, lässt sich doch feststellen, dass die eingetretenen Resorptionssteigerungen offenbar vorwiegend polare Verbindungen betreffen.
Es schien daher von Interesse, den Einfluss solcher die Membranpermeation ändernder Stoffe auf die Steroidresorption zu untersuchen.

Tab.12

Beeinflussung der Membranpermeation durch galenisch-technologische Hilfsmittel

	Hydrocortisonhemisulfat	Hydrocortison	Triamcinolon	Cortison	Fluocortolon	Testosteronazetat
K_{CHCl_3/H_2O}	0.035	3	0.5	45	60	110
% resorbiert in 30 Min. aus 0.9% NaCl Lösung	5	16	10	30	42	49
1 % Komplexon III	22	28	39	32	45	47
Saponin						
5 mg %	10	16	18	—	41	—
200 mg %	20	30	43	33	42	46
1000 mg %	25	26	21	20	25	15
Texapon K 12						
5 mg %	7	27	10	—	—	—
200 mg %	11	37	38	28	42	49
1000 mg %	27	20	25	22	21	10
Myrj 53						
5 mg %	—	—	—		—	—
200 mg %	15	25	32		42	50
1000 mg %	31	19	20		25	23

Aus Tabelle 12 ist ersichtlich,dass in Gegenwart von Temsiden (Saponin,Laurylsulfat,Polyäthylenglykol-4oo-monostearat) und von Komplexon III nur die relativ polaren Steroide ausgeprägte Steigerungen der Resorptionsraten aufweisen. Die Steigerung ist abhängig von der eingesetzten Tensidmenge. Bei hohen Tensidkonzentrationen fällt ganz allgemein die Resorptionsrate ab, da offenbar ein erhöhter Einbau der Steroide in die Tensidmizellen erfolgt.

5.3. Der Einfluss von Gallensäuren und nativer Rattengalle auf die Membranpermeation.

Von Interesse schien in diesem Zusammenhang auch der Einfluss physiologischer Tenside zu sein, da der resorptionsfördernde Einfluss der Gallensäuren bekannt ist.[43,44] Gallensäuren liegen unter physiologischen Bedingungen im Darm überwiegend gepaart mit Taurin oder Glycin vor. Die Erniedrigung der Grenzflächenspannung Wasser/Luft durch Cholat und Desoxycholat liegt bei Konzentrationen unter o.1 mmol/Liter in Höhe der Werte von Laurylsulfat. Unverdünnte Rattengalle erreicht die selben Werte. Tabelle 13 zeigt,dass auch bei den Gallensäuren und der nativen Rattengalle nur die relativ polaren Steroide eine Steigerung der Resorptionsraten aufweisen.

Tab. 13

Einfluß von Gallensäuren und nativer Rattengalle auf die Cäcumpermeation von Steroiden

	Hydrocortison-hemisulfat	Hydrocortison	Östradiol	Progesteron	Testosteron	Testosteron-azetat
% resorbiert in 30 Min.	5	16	58	74	64	49
Na-Cholat 1 mmol	7	18	60	73	63	49
Na-Desoxycholat 0,1 mmol	15	22				51
1 mmol	20	32	53	72	55	55
Native Rattengalle 1 : 10 verdünnt	8	29	61	74	65	48
Native Rattengalle 1 : 5 verdünnt	10	28	61	73	66	48

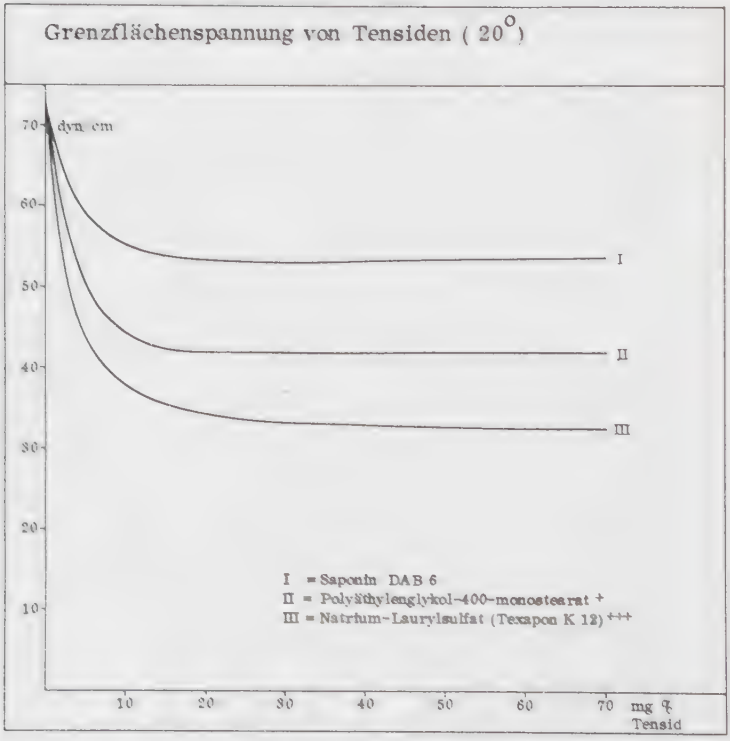
Auffällig ist die Wirkung des Desoxycholats auf die aktiv transportierten Steroide Östradiol und Testosteron. Hier kommt es zu einer ausgeprägten Verminderung der Resorptionsraten, da der aktive Transportmechanismus offenbar gehemmt wird.

6. Zum Mechanismus der Resorptionssteigerung in der Cäcummembran.

6.1. Grenzflächenproblem?

Da Tenside die Grenzflächenspannung Luft/Wasser stark erniedrigen, lag zunächst nahe, den resorptionssteigernden Effekt der Tenside als Grenzflächenphänomen zu deuten. Untersucht man die Grenzflächenspannung wässriger Tensidlösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, (Abb.15)

Abb.15



so stellt man fest,dass die Grenzflächenaktivität der untersuchten Tenside verschieden hoch ist. Man sollte daher erwarten,dass bei gleicher Tensidkonzentration Unterschiede in der Veränderung der Resorptionsrate zu erkennen sein sollten. Dies war jedoch nicht der Fall. Wohl war eine Abhängigkeit der Resorptionssteigerung von der Tensidkonzentration zu erkennen, nicht jedoch von der Oberflächenspannung der eingesetzten Lösungen.

6.2. Verdrängung von Pharmaka aus einer Eiweissbindung an der Mucosa des Cäcums?

Die Verdrängung von Pharmaka aus der Bindung an Eiweissstoffe durch Tenside ist bekannt. [45] [46] Somit gäbe sich eine weitere Möglichkeit,Die Resorptionssteigerung der polaren Steroide zu erklären. Zu erwarten wäre dann, dass die relativ polaren Steroide im Gegensatz zu den weniger polaren bevorzugt aus einer eventuellen Bindung an Mucosaproteine verdrängt werden.Vorausgesetzt,dass die Art der Bindung an Mucosaprotein des Cäcums* identisch ist mit der an Rinderalbumin,wäre zu erwarten,dass Tenside nur die polaren Steroide verdrängen und somit ihre Resorptionsrate steigern. Tabelle 14 zeigt jedoch,dass die Verdrängung der Steroide aus der Albuminbindung ganz unspezifisch offenbar polare wie weniger polare Steroide in gleicher Weise trifft.

Eiweissbindung von Steroiden in Gegenwart von Tensid +

	ohne Tensid	0,2 % Texapon K 12
Hydrocortison	0,142	0,0426
Östradiol	2,16	0,368
Progesteron	1,65	0,647
Testosteron	1,725	0,786

+Bindungskapazität ausgedrückt in µmol Steroid/ g Albumin
Steroidlösungen 10^{-5} molar in Phosphatpuffer p_h 7,4 mit 4% Rinderalbumin
Gleichgewichtsdialyse über 48 Std.
Serumalbumin vom Rind, Behring Werke RHD 20, trocken, reinst

Komplexon III besitzt weder nennenswerte Oberflächen - aktivität,noch führt es zu einer Veränderung der Eiweiss-bindung von Steroiden. Somit liegt der Schluss nahe,dass der resorptionsfördernde Effekt der genannten Tenside und Komplexbildner für polare Steroide weder als Grenz-flächenphänomen noch Eiweissbindungsvorgang zu deuten ist, sondern in einer direkten Beeinflussung des Membranauf - baues zu suchen ist.

6.3. Diskussion der möglichen Vorgänge.

Takruri [47] beschreibt die Bildung unlöslicher Komplexe von α-und β-Lipoproteiden des Serums mit Tensiden wie Benzalkoniumchlorid und Laurylsulfat.
Gibt man für 3o Min. o.2%ige Natrium-Laurylsulfatlösung in das Rattencäcum ein,wäscht danach mehrmals gut mit 37° warmer KHR Pufferlösung das Organ aus,so zeigt die Membran bei Resorptionsuntersuchungen für polare Steroide weiter erhöhte Durchlässigkeit. Durch den Waschprozess lässt sich die ursprüngliche Membranpermeabilität offen-bar nicht regenerieren. Somit scheint die Membran durch das Laurylsulfat innerhalb der durch das Experiment gesetzten Grenzen irreversibel verändert zu sein.
Untersucht man die Membranpermeation von Steroiden nach vorausgehender Behandlung mit 1%iger Komplexonlösung ,so bildet sich nach Waschen des Organs mit Ca^{++} oder Mg^{++} haltigen Puffern die ursprüngliche Membrandurchlässigkeit zurück. Da das Komplexon III offenbar zu einer Bindung der in der Membran befindlichen mehrwertigen Kationen führt, kann sich nach Einbau von Ca^{++} bzw. Mg^{++} die ur-sprüngliche Membranstruktur zurückbilden.

Diese Ergebnisse erklären die gesteigerte Membranper - meation der polaren Steroide. Setzt man voraus,dass die polaren Pharmaka überwiegend durch Membranporen diffun-dieren,so ist denkbar, dass der mittlere Porendurchmesser

*Bestimmt man die Bindungskapazität von Mucosaprotein für Sulfonamide durch Gleichgewichtsdialyse,so findet man Werte,die mit den von Rieder (Drug Res.13,(1963)81) an Humamalbumin erhaltenen gut übereinstimmen.

von etwa 7 Å [24] sich unter der Wirkung von Tensiden und Komplexon III so weit verändert,dass selbst grössere Moleküle wie z.B. Steroide von etwa 15 Å diese Kanäle passieren können. Da die Kanäle mit Hydratwasser gefüll t sind,bietet sich somit die Möglichkeit,dass die polaren Verbindungen hier wesentlich schneller diffundieren können als die auf die Lipiddoppelschicht angewiesenen weniger polaren Verbindungen.

7. Zur Membranpermeation im alloxandiabetischen Zustand.

Durch intravenöse Alloxangabe können bei verschiedenen Tierspecies die insulinproduzierenden β-Zellen der Pankreas zerstört werden,sodass eine manifeste diabetische Stoffwechsellage entsteht. [48]
Die Schädigung der β-Zellen ist dosisabhängig,selektiv und irreversibel. [49,5o,51]

Bei Gabe von 6 mg Alloxan/1oog Ratte entwickelt sich bei normaler Ernährungslage innerhalb von 3 Tagen ein hochdiabetischer Zustand mit mehr als 2% Glukose im Harn und einem Blutzucker von 25o-6oo mg%.

Banerjee [52] berichtet über die Veränderung des Glukosetransportes im Dünndarm alloxandiabetischer Ratten. Nch Gabe von 3o mg Alloxan/1oo g Ratte wurde festgestellt,dass die Glukoseresorption bei der 'everted sac'Methode nach Wilson-Wiseman erheblich gesteigert ist.
Die Ursache für die gesteigerte Membranpermeation ist nicht bekannt. Geht man davon aus,dass Alloxan eine geringe Stabilität aufweist [5o] und zudem rasch ausgeschieden wird [51] so ist denkbar, dass allein der erhöhte Glukosegehalt des Blutes, und der daddurch bedingte erhöhte osmotische Druck, diese Steigerung der Membranpermeation bewirkt.
Wird die Cäcumresorption von Pharmaka 24 Std. nach Gabe von 6mg Alloxan/1oo g Ratte (9omg%Blutglukose) untersucht, so findet man keine messbare Veränderung der Resorptionsraten. Nach weiteren 48 Std. jedoch,bei einem Blutglukosegehalt von 25o-6oomg% findet man eine Steigerung der Resorptionsraten. Tabelle 15
Dies lässt den Schluss zu,dass die Änderung der Membrandurchlässigkeit allein durch den hochdiabetischen Zustand bedingt ist und keine unmittelbare Alloxanwirkung darstelt stellt.

Unter den experimentellen Bedingungen zeigen nur die durch Diffusion transportierten Verbindungen eine Steigerung der Resorptionsraten,während aktiv transportierte wie Östradiol und Testosteron eine Verringerung aufweisen.

Tab.15

Cäcumresorption im alloxandiabetischen Zustand				
	Alloxantiere		Normaltiere	
	% resorbiert in 30 Min.	Standard abweichung in %	% resorbiert in 30 Min.	Standard abweichung in %
Testosteron	56	7.35	64	4.02
Östradiol	44	17.5	58	2.68
Methenolon	70	8	55	4.94
Progesteron	72	12.45	74	5.12
Testosteron-azetat	56	18	49	4.92
Fluocortolon	48	4.5	42	1.32
Hydrocortison-21-azetat	48	17.5	36	2
Hydrocortison	29	1.5	16	1.5
Hydrocortison-21-hemisulfat	20	12	5	2.25
Testosteron-hemisulfat	16	5.75	5	2.5
Glycodiazin	23	7	19	5

Der aktive Transport ist gekoppelt an in der Membran ablaufende Stoffwechselprozesse. Daher scheint im hochdiabetischen Zustand für Synthesezwecke (Glucuronidierung, Sulfatierung,Phosphorylierung) erforderliches ATP nicht mehr in genügender Menge vorhanden zu sein,um den Transport optimal ablaufen zu lassen .
Untersucht man die Glukoseresorption unter solchen Bedingungen im Cäcummodell,so sollte eine Hemmung zu erwarten sein. Tatsächlich findet jedoch ein Einströmen

von Glukose aus dem Blut in das Cäcum statt,sodass die Konzentration der eingegebenen isotonen Glukose/Mannitlösung (40mg%Glukose) um Faktor 2-3 ansteigt.
Da die Wasserresorption durch Fehlen von Na^+ stark eingeschränkt ist,muss es bei den vorliegenden extrem veränderten osmotischen Bedingungen zu einem Einströmen von Glukose aus dem Blut in das Cäcum kommen,da zwischen Blut und Cäcum,bedingt durch den hohen Blutglukosegehalt,ein hoher Konzentrationsgradient besteht. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Angaben von Mehnert [53] , der durch Infusion unphysiologisch hoher Glukosemengen ein Abströmen von Glukose aus dem Gefäßsystem in das Darmlumen feststellen konnte. Diese Tatsache steht auch nicht im Widerspruch zu den Bedingungen des aktiven Transportes, da zwar die Resorption gerichtet vom Lumen nach Serosa abläuft, eine Diffusion durch Membranporen sowohl von Serosa nach Mucosa wie auch umgekehrt nicht ausgeschlossen ist.

8. Diskussion .

Bei der Entwicklung neuer Arzneiformen steht am Anfang die Prüfung in einem biologischen System. Die optimale Darreichungsform und Dosierung wird in der Regel durch zeitliches Verfolgen der Konzentration des Pharmakons im Blut ermittelt.
Blutspiegelangaben alleine machen jedoch nicht in jedem Falle eine unmittelbare Aussage über ablaufende Resorptionsvorgänge . Durch Verteilung im Organismus,Elimination Metabolisierung,enterohepatischen Kreislauf u.a. sind solche Vorgänge oft schwer zu übersehen,sodass genaue Aussagen erst durch Bilanzstudien gemacht werden können.

Solange über in einem biologischen System ablaufende Vorgänge noch keine vollständige Kenntnis besteht,ist man gezwungen,erste Informationen an einem Modell zu sammeln, das in erster Näherung dem biologischen System entspricht. Beschränkt man sich darauf,unter Resorption die zeitliche Änderung definierter Dep ots eines Pharmakons zu verstehen so lassen sich zunächst störende Parameter leicht aus - schalten. Betrachtet man den Resorptionsvorgang als Transportprozess durch die das Depot begrenzenden Membranen,so lässt sich dieser Vorgang als Membranpermeation disku - tieren. Bei enteralen Resorptionsvorgängen sind daher die Transportvorgänge durch die Membranen des Magen-Darm-Traktes zu untersuchen.

Da es sich bei Transportvorgängen durch biologische Membranen im wesentlichen um Verteilungsvorgänge zwischen dem Medium des Lumens und den Membranlipiden handelt, sind auch eine Reihe von in vitro Methoden vorgeschlagen worden, bei denen die Verteilungsgeschwindigkeit zwischen wässrigen Pufferlösungen und organischen Lösungsmitteln untersucht wird. [54] Daneben werden Diffusionsstudien von Pharmaka aus wässrigen Lösungen an synthetischen Membranen wie Collodium-Lezithin [55] Polyäthylen [41]

Zellophan [41], vernetzter Gelatine [1] u.a. durch - geführt.
Alle Ergebnisse,die durch Verzicht auf ein biologisches Resorptionsmodell erhalten werden,sind jedoch von geringem Wert,da die bei der Resorption ablaufenden Vorgänge nur in grober Näherung mit dem Transport durch synthe - tische Membranen verglichen werden können. So kann weder der Einfluss der Membran auf den Transport untersucht werden,noch die Wechselwirkung Membran/Pharmakon,Hilfsstoff bzw. Stabilisator hierbei erkannt werden.

Für Resorptionsuntersuchungen in vivo wird die Ratte häufig benutzt. [8] [13] Der Vorzug des in dieser Arbeit benutzten Rattencäcums liegt einmal in der leichten Präparierbarkeit des Organs sowie in der Möglichkeit,auch Suspensionen eines Pharmakons in die Untersuchungen einzubeziehen. Bedenkt man ferner,dass eine Reihe von Pharmaka wie Sulfonamide oder Steroide in mehreren Kristallmodifikationen vorkommen, die zum Teil extreme Unterschiede in ihren Löslichkeiten aufweisen,könnte es erforderlich sein,die Abhängigkeit der Resorption von solchen Strukturen zu untersuchen.

Die Gleichwertigkeit der Membranen des Rattenintestinums in Hinsicht auf ihre Resorptionseigenschaften,ermöglicht die Verwendung des Rattencäcums als Resorptionsmodell. Die von anderen Autoren benutzte Methode der Perfusion definierter Darmabschnitte (von Ratte,Kaninchen etc.) birgt einige methodische Unzulänglichkeiten in sich.Die unvollständige Entleerung des Rattendarmes,selbst nach mehrtägigem Hungern der Tiere,führt oft zum unphysiologisch hohen Anstieg des intraluminalen Druckes,im Extremfall sogar zum Platzen der Darmwand. Perfundiert man mit niedriger Vorschubgeschwindigkeit, so ergeben sich lange Verweilzeiten des Pharmakons im Darm,mit entsprechend hohen Resorptionsraten.Perfundiert man dagegen mit schnellem Vorschub,so ergeben sich zwangsläufig niedrige Resorptionsraten.

Die kinetische Behandlung der Ergebnisse aus solchen Resorptionsuntersuchungen stellt sich daher etwas schwierig, lässt aber unter definierten Bedingungen doch Angaben zu wie etwa µmol resorbiert/Zeiteinheit/Längeneinheit bzw Gewichtseinheit Darm oder Darmmucosa etc.

Um bessere Aussagen über die Resorptionskinetik machen zu können, ist es notwendig, die zeitliche Änderung eines Pharmakondepots zu verfolgen. Durch Einführung des Begriffes Membranpermeationskonstante K_{perm} ergibt sich die Möglichkeit, die Resorptionsgeschwindigkeit per diffusionem resorbierter Pharmaka zu vergleichen.
Die Resorption der Steroide verläuft nach den Gesetzen der Diffusion. Aktive Transportleistungen der Membran des Intestinums werden dann erkennbar, wenn kurzkettige Fettsäureester geringere Resorptionsraten aufweisen als die Stammverbindungen. Bei Resorptionsuntersuchungen in Gegenwart von Stoffwechselinhibitoren zeigen aktive Mechanismen Hemmung der Transportrate, während Diffusionsprozesse nicht beeinträchtigt werden. [2o]
Die Resorptionsgeschwindigkeit von Steroiden zeigt deutliche Abhängigkeit von der Lipidlöslichkeit der Verbindungen. Nach den Gesetzen der non ionic diffusion werden bei schwachen Elektrolyten die nicht dissoziierten Anteile, weil besser lipidlöslich, besser resorbiert. als die ionisierten. Die Azidität von Äthinylsteroiden und phenolischen Steroiden ist jedoch so gering, dass diese funktionellen Gruppen nicht zur Geltung kommen und die Resorptionsrate ebenfalls nur von der Lipidlöslichkeit bestimmt wird. Bei Steroidhemisulfaten wurde erwartet, dass sie wie die Fettsäureester von den Esterasen des Cäcums gespalten werden. Bei Inkubation der Hemisulfate von Hydrocortison, Fluocortolon und Testosteron konnte jedoch keine Spaltung festgestellt werden. Die relativ niedrige Resorptionsrate der Hemisulfate ist durch die hohe Polarität der Verbindungen bedingt.

Wie eingangs erwähnt, wird die Resorptionsrate einerseits bestimmt durch das Pharmakon und andererseits durch das biologische System. Will man zu veränderten Resorptionsraten kommen,besteht neben der Möglichkeit der Derivatbildung,die Möglichkeit, Einfluss auf das biologische System zu nehmen.Insbesondere die Veränderung der Membrandurchlässigkeit durch Pharmaka bzw. galenisch technologische Hilfsstoffe verspricht hier Erfolg. Die an sich geringe Resorptionsrate oral verabreichter Glykoside wie z.B. Strophantin wird durch Einbetten in das Tensid Laurylsulfat so weit erhöht, dass hierdurch erst eine rationelle orale Strophantintherapie ermöglicht wird. [56]
Da jedoch der Einfluss von Tensiden auf biologische Membranen zur Zeit noch wenig untersucht ist, die pharmazeutische Technologie jedoch regen Gebrauch von diesen Stoffen macht,scheint noch intensive Bearbeitung dieses Problems angebracht,
Komplexon III wird als Stabilisator pharmazeutischen Zubereitungen oft zugesetzt. Als starker Elektrolyt oral berabreicht,scheint es kaum resorbiert zu werden. [21] Die medizinische Verwendung als Antidot bei Schwermetallintoxikationen ist bekannt. [57] Deshalb würde nichtsgegen eine Anwendung dieses Stoffes als resorptionsförderndes Mittel sprechen.
Bei Tensiden sind ausser Hämolyse von Erythrocyten und Präcipitation von Lipoproteiden des Serums bisher keine weiteren Auswirkungen auf biologische Systeme beschrieben worden,sodass vor einer weiten Verwendung dieser Stoffe in biologischen Systemen noch eingehende Prüfung an ihnen durchgeführt werden müssten.

In der vorligenden Arbeit wurde auch die enterale Resorption von Pharmaka im experimentell erzeugten Diabetes untersucht. Die aus den Versuchen erkennbare

Steigerung der Resorptionsraten lässt den Schluss zu, dass der Membranaufbau im hochdiabetischen Zustand gestört ist. Obwohl genauere Aussagen erst unter Hinzuziehung elektronenoptischer Methoden gemacht werden können, legen die Befunde doch nahe, im hochdiabetischen Zustand die Frage nach der optimalen Dosierung eines Pharmakons neu zu stellen.

9. Experimenteller Teil.

9.1. Die Bestimmung des nicht resorbierten Anteils von Pharmaka aus dem Dünndarm und Cäcum der Ratte in situ.

Prinzip: Die gelöste Substanz wird in das Cäcum bzw. in den Dünndarm eingebracht. Nach bestimmten Zeiten wird der nicht resorbierte Anteil direkt oder nach Extraktion bestimmt.

9.2. Vorbereitung der Tiere.

Verwendet wurden weibliche Albinoratten im Gewicht von 250-300 g. (Rasse FW 49 Wulf)

Da der Rattendarm selbst nach mehrtägigem Hungern der Tiere noch erhebliche Kotmengen enthält, die die Extraktion und Bestimmung der zu untersuchenden Substanzen erschweren, muss vor Versuchsbeginn für deren restlose Entfernung gesorgt werden.

Folgende Methode hat sich hierbei als zweckmässig erwiesen:

1. Tag: Morgens und abends erhalten die Tiere per os jeweils 5 ml einer körperwarmen 10%igen Mannitlösung mit der Schlundsonde verabreicht
2. Tag: 15%ige Rohrzuckerlösung mit 0.9%NaCl ad lib.
3. Tag: nüchtern

Trinkwasser an allen Tagen ad lib.

9.2.1. Resorptionsversuche am Dünndarm der Ratte.

Am Versuchstage wurden die Tiere mit 7 mg Nembutal (wässrige Lösung 10 mg= 1 ml) durch intramuskuläre Injektion anästhesiert. Nach Eröffnen der Bauchhöhle durch einen Medianschnitt wurde in das Duodenum unterhalb der Einmündung des ductus choledochus ein Polyäthylenschlauch von etwa 1.5 mm lichter Weite eingebunden. Am terminalen Ileum, vor Einmündung in das Cäcum wurde ein Polyäthylenschlauch von 5 mm lichter Weite eingebunden. Anschliessend wurde die Bauchdecke durch Wundklammern wieder verschlossen.

Um restlichen, nicht abgegangenen Stuhl zu entfernen, wurde der gesamte auf die beschriebene Weise begrenzte Dünndarm mit insgesamt 2oo ml körperwarmer physiolo - gischer Kochsalzlösung durchgespült (Rekordspritze) . Nach beendeter Darmspülung wurden die Tiere in eine Klimakammer von 37° gelegt.
Der untere Polyäthylenschlauch wurde abgeklemmt und die Lösung des Pharmakons durch den oberen Schlauch mit Hilfe einer Rekordspritze mit Flügelkanüle in den Darm eingegeben.Insgesamt können etwa lo-15 ml Lösung in den Darm eingegeben werden. Durch leichte Massage erfolgte gleichmässige Verteilung der injizierten Menge an Pharmakonlösung über die gesamte Darmlänge.
Nach beendetem Versuch wurden die Tiere durch Nacken - schlag getötet,der gesamte Dünndarm herauspräpariert und anhaftendes Blut mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Der gesamte Darminhalt wurde anschliessend mit loo ml physiologischer Kochsalzlösung herausgespült und analytisch aufgearbeitet.

9.2.2. Resorptionsversuche am Rattencäcum.
Die Tiere wurden wie unter 9.2. beschrieben anästhesiert Durch einen Querschnitt in das untere Abdomen wurde das Cäcum frei präpariert. Vom terminalen Ileum und Colon ascendens her wurden Polyäthylenschläuche von 1.5 mm lichter Weite in das Cäcum eingeführt und fixiert.
Die im Cäcum befindlichen Reste des Darminhaltes wurden durch vorsichtiges Spülen mit etwa 5o-loo ml körper - warmer physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Nach dem Spülen wurde das Cäcum reponiert und die Bauchdecke durch Wundklammern verschlossen,sodass nur die beiden Polyäthylenschläuche durch die Bauchdecke ragten. Ein Schlauch wurde mit einer Klemmschere abgeklemmt und durch den zweiten Schlauch 5 ml der Lösung bzw. Suspension des zu untersuchenden Pharmakons mit einer Rekordspritze mit Flügelkanüle in das Cäcum eingegeben.

Nach Versuchsende wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet,das Cäcum herauspräpariert,mit physiologischer Kochsalzlösung von anhaftendem Blut befreit, aufgeschnitten und das Organ sowie die Schläuche mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült.In der Regel genügen 50 ml Kochsalzlösung, um das Organ von anhaftender Pharmakonlösung zu befreien.

Bei Suspensionen hat es sich als zweckmässig erwiesen, das Organ nicht mit physiologischer Kochsalzlösung sondern mit Methanol zu waschen,um die nicht resorbierten Substanzpartikel quantitativ zurück zu gewinnen.

Die Tiere können auch mehrmals hintereinander in den Versuch genommen werden. In solchen Fällen wird am lebenden,narkotisierten Tier das Cäcum nach Versuchsende mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung in kleinen Portionen ausgespült.Insgesamt genügen ebenfalls 50 ml Lösung.Bei genügend vorsichtiger Handhabung der Spülung und ausreichender Tiefe der Narkose können die Tiere mehrmals hintereinander(bis zu 6 Std. Gesamtdauer) in den Versuch genommen werden.

9.3. Resorptionsuntersuchungen am isolierten Rattendünndarm.

9.3.1. Präparation des Rattendünndarmes: 'everted sac ' Methode

Es wurde eine Modifizierung der von Wilson-Wiseman [29] angegebenen Methode des umgestülpten Rattendarmes benutzt.

Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet,das Abdomen durch einen Mittelschnitt eröffnet und der gesamte Darm frei präpariert. Benutzt wurden jeweils 15 cm lange Stücke des terminalen Ileums. Die Darmstückchen wurden auf einen Polyäthylenschlauch von 2.5 mm lichter Weite gezogen. Am oberen Ende des Schlauches wurde der Darm angebunden und vorsichtig über den Schlauch zurück gerollt,sodass die Mucosa nach aussen gestülpt wurde und die Serosa nach innen. Der Darm wurde sorgfältig mit KHR Puffer (3mmol Glukose!) gespült und das untere

Ende des Darmes abgebunden.An das untere Ende wurde ein kleiner Glasstab gebunden,um den Auftrieb des Säckchens im Inkubationsmedium zu kompensieren.In den auf diese Weise präparierten 'everted sac' konnten jeweils 1.5 ml der zu untersuchenden Lösung bzw.Pufferlösung eingegeben werden. Das Darmsäckchen wurde in ein weites Reagenzglas von etwa 2o mm lichter Weite und 2o cm Länge eingebracht. Die Reagenzgläser wurden mit etwa 5o ml der zu untersuchenden Lösung gefüllt,mit einem zur Kapillare ausgezogenen Gaseinleitungsrohr versehen und in ein Wasserbad von 37° eingehängt.Die Begasung erfolgte mit einem Gasgemisch bestehend aus 95% O_2 und 5% CO_2.Die Fixierung des Polyäthylenschlauches erfolgte mit einer kleinen Klammer am oberen Rande des Reagenzglases,sodass die Darmsäckchen ständig von der Prüflösung benetzt blieben. Der in kleinen Bläschen entweichende Gasstrom sorgte für ständige Durchmischung des Röhrcheninhaltes. Nach Versuchsende wurden die Darmsäckchen den Röhrchen entnommen,mit Pufferlösung abgespült und aufgeschnitten. Der ablaufende Inhalt des Darmsäckchens wurde analytisch aufgearbeitet.

9.3.2. Nachweis des aktiven Transportes von Steroiden am 'everted sac' Modell.

Die unter 9.3.1. beschriebenen Darmsäckchen wurden jeweils mit 1.5 ml KHR Puffer (3mmol Glukose!) gefüllt und in das Aussenmedium eingebracht. Es wurde die zeitliche Zunahme der Radioaktivität im Innenmedium verfolgt. Östradiol und Testosteron errichten einen Konzentrationsgradienten,d.h. der Quotient der Radioaktivität gleicher Volumina des Innen / Aussenmediums übersteigt im Resorptionsverlauf den Wert 1 erheblich.

Soweit die untersuchten Steroide radioaktiv markiert vorlagen,konnte festgestellt werden,dass durch Diffusion immer ein Konzentrationsausgleich zwischen Serosa - und Mucosamedium angestrebt wird.

9.3.3. Untersuchung der Esterresorption am 'everted sac'.

Die unter 9.3.1. beschriebenen Darmsäckchen wurden in das Inkubationsmedium eingegeben,das die jeweiligen radioaktiv markierten Steroidester gelöst enthielt.Es wurde die Zeitabhängigkeit der Radioaktivität des Quotienten von Steroidester/Steroidalkohol im Serosa- und Mucosamedium verfolgt.
Die Aufarbeitung des Serosa-bzw. Mucosamediums erfolgte in der Weise,dass die radioaktiv markierten Steroid - ester nach Sättigung der Wasserphase (zu 5o%) mit Ammonsulfat, dreimal mit dem selben Volumen eines Gemisches aus Äther:Chloroform:Äthanol 3:1:o.5 (v/v) extrahiert wurden.Extraktionsdauer je 3o Min. Die vereinigten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum vom Lösungsmittel befreit,in wenig Chloro - form gelöst und nach Zugabe von je 5oγ nicht markierten Steroids dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel - platten von o.25 mm Schichtdicke durch zweimaliges Entwickeln getrennt.(Kieselgel Merck mit Fluorescenzindikator GF 254,System Essigester/Benzol 1: 3 (v/v). Während die Steroidester mit der Lösungsmittelfront laufen,bleiben die Steroidalkohole bzw. die polaren Spaltprodukte am Start zurück. Unter der UV Lampe(254nm) wurden die Flecken markiert,die Kieselgelschicht von der Glasplatte geschabt und in Polyäthylenmessgefässen mit 4 ml Methanol übergossen. Nach Stehen über Nacht wurden die Proben mit 15 ml Toluolszintillator aufgefüllt und die Radioaktivität gemessen.

9.4. Experimentelle Erzeugung eines Alloxandiabetes.

Mit Standardfutter ernährten Ratten im Gewicht von 25o-3oo g wurden 2.5 - 3 ml einer 6oo mg%igen Alloxanlösung mit o.9% NaCl langsam in die Schwanzvene injiziert.(6mg Alloxan/1oo g Ratte) Während der Versuchsdauer wurden die Tiere mit 15 %iger Zuckerlösung (mit o.9% NaCl) ernährt. Trinkwasser an allen Tagen ad lib. In der Regel entwickelt sich in den nächsten 3 Tagen ein hochdiabetischer Zustand.Die Tiere beginnen

bereits nach 12 Std. geringe Mengen Glukose mit dem Harn auszuscheiden.Am dritten Tag post injectionem scheiden die Tiere bereits einen Harn mit mehr als 2 % Glukose aus. Die Blutglukose beträgt hierbei 25o-6oo mg% . Da die Tiere in diesem Zustand stark gestresst sind, können sie für Resorptionsuntersuchungen am Cäcum nur einmal verwendet werden. Zu beachten ist besonders die veränderte Narkoseempfindlichkeit der Tiere. Es darf nicht die gesamte Nembutaldosis (7mg/Tier) auf einmal injiziert werden. Man beginnt zunächst mit etwa 4 mg Nembutal/Tier i.m. oder i.p. und steigert dann im Verlauf des Versuches ,wenn erforderlich, die Dosis jeweils um 1 mg .
Es hat sich auch als zweckmässig erwiesen,eine Basisnarkose durch i.p.Injektion von 5 mg Nembutal zu erzeugen und während des Versuches die Tiere durch leichten Ätherrausch zu anästhesieren,wobei jedoch auf genügend tiefe Atmung der Tiere zu achten ist.

9.5. Gewinnung von Mucosaprotein.

Das Cäcum der unter 9.2. vorbehandelten Tiere wurde in Nembutalnarkose mit etwa loo ml physiologischer Koch - salzlösung ausgespült,um restlichen Darminhalt zu entfernen.Anschliessend wurden 5 ml physiologischer Kochsalzlösung in das Cäcum eingegeben. Nach 3o Min.wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet,das Cäcum durch Waschen mit Kochsalzlösung von anhaftendem Blut befreit und aufgeschnitten.
Von 2o Ratten wurden auf diese Weise etwa 9o ml Mucosaproteinlösung gewonnen.Durch scharfes Zentrifugieren wurde diese Lösung von Mucinflöckchen befreit.Die Aufbewahrung erfolgte in der Kältetruhe bei -lo^{o}, Bei Injektion von 5 ml physiologischer Kochsalzlösung und 3o Min. Versuchsdauer resultierte eine Lösung,die nach Lowry bestimmt etwa 17o mg% Protein enthielt.

9.6. Elektrophorese von Mucosaprotein.

Zur Elektrophorese wurden 5 ml der unter 9.5.gewonnenen Mucosaproteinlösung 48 Std. gegen destilliertes Wasser dialysiert,um die Lösung frei von NaCl zu machen. Anschliessend wurde die Mucosaproteinlösung im Vakuum bei 2o° auf 1/1o des Ausgangsvolumens eingeengt. Die resultierende Lösung war klar und hellgelb gefärbt. Zur Elektrophorese wurden 1oo µl der eingeengten Mucosaproteinlösung aufgetragen.Die Elektrophorese erfolgte auf Membranfolie Schleicher-Schüll in Veronalpuffer von p_H 8.6. bei einem Spannungsgefälle von 1o V /cm über 4 std. Die Anfärbung erfolgte mit Amidoschwarz 1o b. Nach Versuchsende wurde die Folie durch Besprühen mit Eisessig transparent gemacht und nach Trocknen an der Luft densitometrisch ausgewertet.

9.7. Esteraseaktivität des Mucosaproteins.

Die Prüfung des Mucosaproteins auf Esteraseaktivität erfolgte in der Weise,dass 32 γ Tripalmitin (^{14}C markiert im Glycerinanteil) und 16 γ Hydrocortison - azetat (^{3}H markiert im Steroidanteil) als Lösung in Benzol in 2o ml fassende Erlenmeyerkölbchen eingebracht wurden. Das Lösungsmittel wurde im N_2 Gasstrom abgeblasen,Der Rückstand wurde mit o.2 ml Äthanol 96 % versetzt und bei 37° im Schüttelthermostaten mit 5 ml Mucosaproteinlösung inkubiert. Nach 3o. bzw. 6o Min. wurde die Inkubation durch Zugabe von 1o ml Äther / Chloroform 3:1 (v/v) gestoppt. Die Proben wurden dreimal mit je 5 ml Äther/Chloroform 3:1 extrahiert. die vereinigten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in wenig Chloroform aufgenommen und auf Kieselgelplatten (Kieselgel Merck) aufgetragen. Entwickelt wurde im System Chlroform 95: Methanol 5 (v/v). Während die Ester mit der Lösungsmittelfront laufen,bleiben die Spaltprodukte am Start zurück.Die Verteilung der Radioaktivität auf den Dünnschicht -

plattenwurde mit einem DC-Scanner markiert(DC-Scanner der Fa.Prof.Berthold,Wildbad), das Kieselgel von den Platten geschabt,mit 4 ml Methanol übergossen und nach Stehen über Nacht mit 15 ml Toluolszintillator aufgefüllt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Tricarb-Spectrometer der Fa.Packard.
Es wurde gefunden,dass das Tripalmitin nach 3o Min. zu 13 % und nach 6o Min. zu 21 % gespalten war.
Das Hydrocortisonazetat war bereits nach 3o Min.vollständig gespalten.
Der Ausgangsgehalt an Spaltprodukten betrug im Tripalmitin o.6% ,bei Hydrocortisonazetat o.1%.Dies wurde bei der Berechnung der Verseifungsraten entsprechend berücksichtigt.

9.8. Spaltungsgeschwindigkeit von Steroidestern durch Mucosaprotein.

Die Spaltungsgeschwindigkeit der Steroidester wurde wie unter 6. beschrieben untersucht.Die Inkubation der radioaktiv markierten Ester erfolgte mit 5 ml Mucosaproteinlösung,die zuvor mit o.1 m Phosphatpuffer von p_H 7.4 1 : 5 verdünnt worden war. Die im Steroidanteil markierten Ester wurden mit so viel nicht markierter Substant verschnitten,dass die Ansätze jeweils $1o^{-8}$ mol Steroidester enthielten.
Um den Anteil an Spaltprodukten,die die radioaktiv markierten Steroide enthielten zu ermitteln,wurden sie vor Inkubationsbeginn dünnschichtchromatographisch untersucht.Als Spaltprodukt wurde die Aktivität auf den DC Platten angesehen,die sich chromatographisch wie der jeweilige Steroidalkohol verhielt,d.h. nach Entwicklung des Chromatogramms am Start verblieb.Bei der Berechnung der Verseifungsraten wurden sie entsprechend berücksichtigt.

Der Gehalt an Spaltprodukten betrug bei :

Hydrocortisonazetat	4.5%
Testosteronazetat	16 %
Fluocortolonazetat	2 %
" butyrat	o.4 %
" capronat	o.4 %
" trimethylazetat	3.5 %

9.9. Bestimmung der Eiweissbindung von Steroiden.

Die Eiweissbindung der untersuchten Steroide wurde durch Gleichgewichtsdialyse 4%iger Rinderalbuminlösung in o.1 m Phosphatpuffer 7.4 gegen radioaktiv markierte Steroidlösung,die durch Verschneiden mit nicht markierter Substanz auf 10^{-5} molar gebracht wurde,ermittelt. Jeweils 4 ml 4 %ige Rinderalbuminlösung (Serumalbumin vom Rind ,RHD 2o Behring Werke) wurden in Dialyse - schläuche von 9 mm Ø und 15 cm Länge eingegeben. Die Säckchen wurden in 5o ml fassende Schüttelzylinder eingehängt. Die an einem sich langsam drehenden Rührwerk befestigten Säckchen wurden 48 Std. bei Raumtemperatur dialysiert.Aus der Differenz der Radioaktivität in Aussen- und Innenmedium wurde nach Umrechnung auf 1 g Albumin die Bindungskapazität berechnet.
Bei den Versuchen mit Tensid bzw. mit Komplexon III wurde die Substanz in der angegebenen Konzentration im Aussenmedium gelöst.

9.1o. Analytik

9.1o.1. Extraktion.

Sulfonamide und Glukose konnten direkt aus der Waschflüssigkeit des Rattencäcums bzw. Dünndarmes heraus bestimmt werden. Sofern die Steroide und Steroidester nicht radioaktiv markiert vorlagen,erfolgte die Ex - traktion der Wasserphase mit Äther/Chloroform 3:1 , wobei das gleiche Volumen Wasser-und Lösungsmittelphase in geeigneten Schliffröhrchen für 3o Min.geschüttelt wurde. Die vereinigten Äther/Chloroformphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum einge - dampft. Die Extraktion des nicht radioaktiv markierten Glycodiazins erfolgte aus dem Waschwasser des Rattenintestinums,nach Ansäuern mit o.2 n Phosphorsäure,durch Essigester. Radioaktiv markiertes Glycodiazin wurde unmittelbar durch Messung der Radioaktivität des Waschwassers bestimmt.

9.1o.2. Quantitative Bestimmung.

Sulfonamide wurden nach Bratton-Marshall [58] bestimmt.
Die Glukosebestimmung wurde enzymatisch mit dem Blut - zucker Farbtest Böhringer durchgeführt.
Die Proteinbestimmung in der Mucosaproteinlösung er - folgte nach Lowry. [59]
Glycodiazin wurde in einer Modifizierung der Vorschrift nach Toolan-Wagner bestimmt. [6o]
5 ml Darmwaschflüssigkeit wurden mit 5 ml o.2 n Phos - phorsäure versetzt und dreimal mit 5 ml Essigester extrahiert.Die vereinigten Essigesterextrakte wurden im Vakuum abgedampft und in wenig Essigester aufgenommen. Der Glycodiazinextrakt wurde auf 4 cm breite Streifen Whatman 1 Chromatographiepapier aufgetragen und absteigend (16 Std) im System Isopropanol-Ammonkarbonatpuffer 3 : 1 (v/v) entwickelt.
Unter der UV Lampe wurde das Glycodiazin markiert, die Zone herausgeschnitten und in kleine Papierstreifen zerschnitten. Diese Papierstreifen wurden 3o Min. mit 5 ml Borax-Phosphatpuffer $p_H 9$ extrahiert. Die Ansätze wurden anschliessend scharf zentrifugiert,um Papierfasern zu entfernen und der Überstand bei 242 nm im Spektrofotometer gemessen. Der Gehalt an Glycodiazin wurde aus einer Eichkurve erhalten,die durch Aufarbeitung definierter Mengen (1o - 1ooγ) Glycodiazin nach Zugabe zu Leerdarmwaschflüssigkeit erhalten wurde.

Die Bestimmung der Δ^4 bzw. $\Delta^{1,4}$ 3- Ketosteroide erfolgte mit INH Reagenz nach Weichselbaum. [61]
Die eingeengten Steroidextrakte wurden mit INH Reagenz übergossen und nach 6o Min. die Δ^4 3-Ketosteroide bei 38o nm und die $\Delta^{1,4}$ 3-Ketosteroide bei 41o nm gegen INH Reagenz fotometriert. In Abzug gebracht wurde ein Leerwert,der durch Extraktion gleicher Mengen Leerdarmwaschflüssigkeit erhalten wurde.

9.1o.3. Messung der Radioaktivität.

Die Verteilung der Radioaktivität auf Kieselgeldünnschichtplatten erfolgte durch Auswertung unter einem Dünnschicht-Scanner der Fa. Prof. Berthold Wildbad .

Die Bestimmung der Radioaktivität in Eluaten von Kieselgelplatten bzw. Waschflüssigkeiten des Rattenintestinums erfolgte mit einem Tricarb-Spectrometer (Serie 3ooo Packard Instruments,Ill.USA)
Die Methanoleluate (4ml Methanol) wurden mit 15 ml Toluolszintillato r aufgefüllt,während zur Messung der Radioaktivität in wässrigen Lösungen o.5 ml der Wasserphase mit 4 ml Methanol versetzt und mit 15 ml Dioxan - szintillator aufgefüllt wurden. [62]
Diskriminatoreinstellung und Verstärkungseinstellung am Gerät wurden vom Hersteller vorgenommen und ergaben eine Zählausbeute für ^{3}H von 5o% und für ^{14}C von 85 %.

9.11. Verwendete Substanzen und Lösungen.

Die nicht radioaktiv markierten Substanzen wurden in Form ihrer Lösungen in physiologischer Kochsalzlösung angewendet. Ihre Konzentration betrug,durch die geringe Löslichkeit bedingt $1o^{-4}$ - $1o^{-5}$ Mol/Liter.
Die radioaktiv markierten Substanzen (Steroide wurden in der Radioisotopenabteilung der Schering A.G. Berlin synthetisiert, Tripalmitin wurde vom Radiochemical Center Amersham,England bezogen) wurden,so weit erforderlich chromatographisch gereinigt.(Esterresorption)
Die radioaktiv markierten Substanzen wurden durch Verschneiden mit nicht markierter Substanz ebenfalls auf $1o^{-4}$ - $1o^{-5}$ Mol/Liter gebracht.
Verabreicht wurden bei den Versuchen am Rattendünndarm jeweils 1o ml der Lösungen (=o.1µCi), am Rattencäcum jeweils 5 ml (=o.o5µCi).

^{3}H markierte Verbindungen (Angaben in mCi/mmol)

Hydrocortison	4×10^{2}
'' azetat	2×10^{2}
'' hemisulfat-Na	60
Testosteron	10^{3}
'' azetat	6×10^{2}
'' propionat	1.3×10^{2}
'' hemisulfat-Na	40
Fluocortolon	2.5×10^{3}
'' azetat	2.5
'' butyrat	3×10^{3}
'' capronat	''
'' trimethylazetat	''
'' undecylat	30
'' hemisulfat-Na	5.6
Methenolon	5.25×10^{2}
'' azetat	4.8×10^{2}
Östradiol	4.5×10^{2}
'' valerianat	2×10^{3}
Östron	7×10^{2}
Äthinylöstradiol	1.1×10^{2}
19-Nor-oxyprogesteron	2×10^{2}
'' capronat	75
Glycodiazin	100

^{14}C markierte Verbindungen (mCi/mmol)

Wyeth 3707	2.5
Cyproteronazetat	1.1
Progesteron	25
Tripalmitin	25.7

Toluolszintillator

50 mg 1.4.-Bis(5-phenyloxazolyl-2)-benzol
4 g Terphenyl (1.4.Diphenylbenzol)
werden in 1000 ml Toluol gelöst.

Dioxanszintillator

loo g Naphthalin
lo g 2.5-Diphenyloxazol
25o mg 1.4-Bis-(5-phenyl-oxazolyl-2)-benzol
werden in looo ml Dioxan gelöst.

Krebs-Henseleit-Ringer Puffer (KHR Puffer)

o.145 molar NaCl, KCl, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $NaHCO_3$
o.ll molar $CaCl_2$
Vor Gebrauch des Puffers wird für eine Stunde ein CO_2 Gasstrom durchgeleitet.
Für die Versuche am überlebenden Organ erhält der Puffer einen Zusatz von 3 mmol Glukose !

Saponin DAB Merck
Myri 53 = Polyäthylenglykol-4oo-monostearat
Fa. Atlas Goldschmidt Essen
Texapon K 12 = Natrium Laurylsulfat reinst
Fa. Dehydag Düsseldorf

Elektrophorese:

Membranfolie zur Elektrophorese Schleicher-Schüll
Veronalpuffer p_H 8.6 : 42 g Veronal werden gelöst in
3oo ml Propylenglykol 1,2
18o ml n NaOH
25oo ml dest.Wasser

Die Anfärbung des Proteins erfolgt mit Amidoschwarz lo b
Der Farbstoff wird zu 1 %o gelöst in einem Gemisch aus
95o ml Methanol
5o ml dest.Wasser
1 %o Oxalsäure
Die Entfernung des überschüssigen Farbstoffes von der Membranfolie erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit dem vorstehenden Lösungsmittelgemisch.

Borax - Phosphatpuffer p_H 9

17 ml einer Lösung von 13.62 g KH_2PO_4/1000 ml
werden auf
100 ml aufgefüllt mit einer Lösung aus 10.1 g Borax/1000ml

Ammonkarbonatpuffer

36.02 g Ammonkarbonat werden mit 3 n NH_3 Lösung
auf 500 ml aufgefüllt.

1o. Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt,dass die qualitativen Resorptionseigenschaften der Membran des Rattencäcums gleichwertig sind mit der Membran des Rattendünndarmes und dass das Rattencäcum ein geeignetes Modell zum Studium der enteralen Resorption darstellt.

Mit diesem Modell wird das Resorptionsverhalten von Steroiden untersucht.

Die Kinetik der Steroidresorption gehorcht dem 1.Fick - schen Diffusionsgesetz.

Durch Einführung des Begriffes Membranpermeationskonstante K_{perm} ergibt sich die Möglichkeit, die Resorptionsge - schwindigkeit verschiedener Steroide miteinander zu ver - gleichen.

Die Resorptionsgeschwindigkeit der durch Diffusion re - sorbierten Steroide hängt in erster Linie von ihrer Lipid- löslichkeit ab. Es wird gezeigt,dass eine gute Korrelation zwischen der Membranpermeationskonstante K_{perm} und dem Verteilungskoeffizienten Chloroform / Wasser besteht.

Unter Verwendung einer Modifizierung der 'everted sac' Methode nach Wilson-Wiseman wird gezeigt,dass von den untersuchten Steroiden nur Östradiol und Testosteron durch einen aktiven Transportmechanismus resorbiert werden.

Es wird nachgewiesen,dass Steroidester im Rattencäcum verseift werden. Die Verseifungsgeschwindigkeit ist ab- hängig von der Struktur der jeweiligen Ester.
Fluocortolonazetat wird langsamer gespalten als die Ester längerkettiger Fettsäuren.
Fluocortolonazetat und Testosteronazetat werden langsamer gespalten als Hydrocortisonazetat.

Am 'everted sac' Modell wird nachgewiesen,dass Steroidester ungespalten die Darmwand durchdringen können.

Das Verhältnis von Steroidester zu Steroidalkohol im Resorptionsverlauf ist abhängig von der Struktur des Esters und kann zugunsten des Esters verschoben werden

1. durch Errichten eines hohen Konzentrationsgradienten an Ester vom Mucosamedium zum Serosamedium z.B.durch Suspendieren von Steroidmikrokristallen im Mucosamedium,da die Permeationsgeschwindigkeit dann die Verseifungsgeschwindigkeit übersteigen kann
2. durch Zugabe eines Esterasehemmers wie Laurylsulfat zum Mucosamedium.

Die Membranpermeation von Steroiden kann durch galenisch technologische Hilfsmittel beeinflusst werden.
Durch Tenside wie Saponin,Laurylsulfat-Na,polyäthylen - glykol-4oo-monostearat und Komplexbildner wie Komplexon III wird die Resorptionsrate der relativ polaren Steroide deutlich erhöht. Diese Steigerung wird durch freie Gallensäuren und native Rattengalle ebenfalls herbeige - führt.

Mit steigender Lipidlöslichkeit der Steroide verringert sich die Möglichkeit einer Resorptionssteigerung.

Im alloxandiabetischen Zustand zeigen die untersuchten Verbindungen Steigerungen der Resorptionsraten.Nur die aktiv transportierten Steroide Östradiol und Testosteron zeigen Verringerung der Resorptionsraten.

Die durch die einzelnen Massnahmen gesteigerte Membranpermeation wird diskutiert.

11. Literatur

[1] Johnson,R.H. Diffusion of drugs in modified gelatin films. J.Pharm.Sci. 54, (1965) 12

[2] Nixon,J.R. Georgakopoulos,P. Carless,J.E. Diffusion from gelatin-glycerin-water gels. J.Pharm.Pharmacol. 19,(1967) 246

[3] Kavanau,J.L. Membrane structure and function. Proc.Seminars Biophys.Phys.Chem. Connectiv Tissue Stowe,Vermont Oct.1965 , 1o96

[4] Korn,E.D. Structure of biological membranes. Science 153 , (196o) 1491

[5] Schanker,L.S. Physiological transport of drugs. Adv.Drug Res. 1 , (1964) 72

[6] Christensen,H.N. Biological transport. W.A.Benjamin Oncorp. New York 1962

[7] Binns,T.B. Absorption and distribution of drugs. E.S.Livingstone Ltd. Edinburgh and London 1964

[18] Wilson,T.H. Intestinal absorption. W.B.Saunders Company Philadelphia-London 1962

[9] Spencer,P.R. The intestinal tract. Charles Thomas Publishers Springfield Ill. USA 196o

[1o] Ruch-Fulton Medical physiology and biophysics. W.B.Saunders Company Philadelphia-London 1961

[11] Bykow,K.M. Lehrbuch der Physiologie. VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1960

[12] Schmidt,W. Morphologische Grundlagen der enteralen Rsorption. Arch.Exp.Pathol.Pharmakol. 250, (1965) 178

[13] Schanker,L.S. Brodie,B.B. Tocco,D.J. Hogben,C.A. Absorption of drugs from the rat small intestine. J.Pharmacol.Exp.Therap.123 , (1958) 801

[14] Johnson,R.B. Peterson,D.A. Tolbert,B.M. Cellulose metabolism in the rat. J.Nutrition 72, (1960) 353

[15] Green,E.C. Anatomy of the rat. Hafner Publishing Company New York 1963

[16] Jaffé,R. Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. Verlag Julius Springer Berlin 1931

[17] Wagnrer,J.G. Biopharmaceutics: Absorption aspects. J.Pharm.Sci. 50 ,(1961) 359

[18] Lees,K.A. Symposium: Fine particles in pharmaceutical practice. J.Pharm.Pharmacol. 13,(1963)435

[19] Milne,M.D.
Scribner,B.H.
Crawford,M.A.
Non ionic diffusion and the excretion of weak acids and bases.
Am.J.Med. 24,(1958) 709

[20] Brodie,B.B.
Some physico-chemical factors in drug action.
J.Pharm.Pharmacol. 9 ,(1957) 345

[21] Vogt,W.
Resorption von Pharmaka durch Diffusion.
Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.
250, (1965) 210

[22] Schanker,L.S.
Passage of drugs across body membranes.
Pharmacol.Rev. 14, (1962) 501

[23] Rummel,W.
Forth,W.
Aktiver Transport und enterale Resorption.
Pharm.Ztg. 28, (1964) 1053

[24] Kruhøffer,P.
The pharmacology of membranes.
J.Pharm.Pharmacol. 13,(1961) 193

[25] Casey,E.J.
Biophysics
Reinhold Publishimg Corp.
New York 1962

[26) Riggs,D.S.
The mathematical approach to physiological problems
The Williams-Wilkins Company
Baltimore 1963

[27] Willbrandt,W. Aktiver Transport durch Grenzflächen. Kli.Woschr.41, (1963) 138

[28] Willbrandt,W. Rosenberg,T. The concept of carrier tranport and its corollaries in pharmacology. Pharmacol.Rev.13,(1961) 1o9

[29] Wilson,T.H. Wiseman,G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. J.Physiol. 123, (1954] 116

[3o] Schedl,H.P. Absorption of steroids from the human intestine. J.Clin.Endocrinol.Metab. 25,(1965) 13o9

[31] Fieser-Fieser Steroide Verlag Chemie Weinheim 1961

[32] G.Kleve private Mitteilung

[33] Janssen,E.T. Steroidester hydrolysis by the rat gut. Arch,Biochem.Biophys.98,(1962)516

[34] Gerhards,E. im Druck

[35] Dirscherl,W. Schneider,R. Schafhausen,G. Rohdewald,M. Zur Kenntnis der Steroidesterase der Leber. Z.Vitamin-Hormon-Fermentforsch. X ,(196o) 335

[36] Freeman,S.
Burrili,M.
Tsan Wen Li
The enzyme inhibitory action of an arylsulfonate and studies on its toxicity when ingested by rats,dogs and humans.
Gastroenterology, 4 ,(1945) 332

[37] Junkmann,K.
Über die Wirkungsweise langwirkender Steroidhormonester.
Arch.exper.Path.Pharmakol. 215, (1952) 85

[38] Finholt,Per
Beeinflussung der Resorption durch die Arzneiform.
Pharm.Ztg. 109, (1964) 616

[39] Speiser,P.
Galenische Aspekte der Arznei - mittelwirkung.
Pharm.Ac.Helv.41, (1966) 321

[4o] Staubesand,J.
Zur Morphologie der Aufnahme und der transzellulären Passage von Stoffen durch Membranvesikulation.
Pharm.Ztg. 109 , (1964) 113o

[41] Appel,W.
Schievelbein,M.
Werle,E.
Der Einfluss von Natriumlaurylsulfat auf die Durchlässigkeit von Membranen und die Resorption aus dem Verdauungstrakt.
Arzneimittelforschung 7,(1957) 742

[42] Lish,P.M.
Influence of surfactants on absorption from the colon.
Toxicol.appl.pharmacol.1,(1959]
5o1

[43] Dawson,A.M. Bile salts and fat absorption. Gut 8, (1967) 1

[44] Pope,J.L. Parkinson,T.M. Olson,J.A. Action of bile salts on the metabolism and transport of water soluble nutrients by perfused rat jejunum in vitro. Biochim.Biophys.Acta 130,(1966) 218

[45] Büttner,H. Kompetitionsphänomene bei der Bindung von Pharmaka an Albumin. Kli.Woschr.45, (1967) 225

[46] Keen,P.M. The displacement of three anionic drugs from binding to bovine serum by various anionic compounds. Brit.J.Pharmacol.26, (1966) 704

[47] Takruri,H. Ecanow,B. Interaction of surfactants with Lipiproteins. J.Pharm.Sci. 55, (1966) 9

[48] Wellmann,K.F. Volk,B.W. Experimenteller latenter Diabetes und Strahlenschutzwirkung. Dtsch.Med.Woschr. 28, (1967) 1283

[49] Coperstein,S.J. Lazarow,A. Distribution of alloxan ^{14}C in islets and other tissues of the toafish. Am.J.Physiol. 207, (1964) 423

[50] Watkins,D. Coperstein,S.J. Lazarow,A. Alloxandistribution (in vitro) between cells and other extra - cellular fluid. Am.J.Physiol.207, (1964) 431

[51] Watkins,D.
Coperstein,S.J.
Lazarow,A.
Effect of alloxan on permeability of pancreatic islets tissue in vitro.
Am.J.Physiol. 2o7, (1964) 436

[52] Banerjee,S.
Varma,S.D.
Transport of glucose in small intestine of alloxan diabetic rats.
Ind.J.exp.Biol. 5 ,(1967) 125

[53] Mehnert,H.
Förster,A.
Kaiser,W.
Die Ausscheidung von Glukose in das Darmlumen der Ratte bei hohem Blutglukosespiegel.
Kli.Woschr. 44, (1966) 844

[54] Perrin,J.
An in vitro model for soluble drug absorption.
J.Pharm.Pharmacol. 19, (1967) 25

[55] Misra,A.L.
Hunger,A.
A note on the diffusion of drugs through artificial phospholipids membranes.
J.Pharm.Pharmacol. 18, (1966) 531

[56] Krause, D.
Förderung und Sicherung der enteralen Resorption von G-Strophantin durch Natriumlaurylsulfat.
Arzneimittelforschung 5, (1955)428

[57] Hauschild,F.
Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie
VEB Thieme Verlag Leipzig
2.Auflage 196o

[58] Bratton,A.C.
Marshall,E.K.
A new coupling component for sulfanilamide determination.
J.Biol.Chem. 128, (1939) 537

[59] Lowry,O.H.
Rosenbrough,H.J.
Farr,A.L.
Randall,R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, (1951) 265

[6o] Toolan,T.J.
Wagner,R.L.
The physical properties of chlorpropamid and its determination in human serum.
Ann.N.Y.Acad,Sci.74,(1958/59] 449

[61] Weichselbaum,T.E.
Margraf,H.W.
Determination of Δ^4 -3-Keto - corticosteroids in human peripheral plasma by the isonicotinic acid (INH) reaction.
J.Clin.Endocrinol. 17,(1957) 959

[62] Wenzel,M.
Schulze,P.E.
Tritium Markierungen
Walter de Gruyter
Berlin 1962

L e b e n s l a u f

Am 14.12.1933 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Alexander Hart in Pressburg [CSR] geboren.In Fleissen/ Sudetenland und in Berlin besuchte ich die Grund - und Mittelschule.

Mit der Mittleren Reife verliess ich 1950 die Mittel - schule.Zunächst war ich als Praktikant in der Industrie tätig,bis ich 1951 bei der Schering A.G. Berlin eine Lehre als Chemielaborant begann. 1954 beendete ich meine Lehre und wurde von der Schering A.G. als Laborant übernommen.

Parallel zu meiner Laborantenlehre besuchte ich die Abendvorlesungen der Staatlichen Ingenieurschule Beuth (Abtg.Technische Chemie). 1955 bestand ich die Abschluss prüfung als Chemotechniker.

Zuerst als Laborant,später als Chemotechniker war ich in den pharmazeutischen Abteilungen der Schering A.G. tätig. 1959 bestand ich die Begabtenprüfung vor dem Wissenschaft lichen Landesprüfungsamt Berlin. Dadurch wurde es mir ermöglicht, ein Hochschulstudium aufzunehmen.

Für das gewählte Ziel Pharmazie leistete ich die vor - geschriebene zweijährige Praktikantenzeit in der Gertruden Apotheke Berlin ab. 1962 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung und begann im Wintersemester 1962/63 an der Technischen Universität Berlin das Studium der Pharmazie. Vom dritten Semester an setzte ich das Studium an der Freien Universität Berlin fort.

Im November 1965 bestand ich die pharmazeutische Staats- prüfung.

Im Anschluss an mein Studium begann ich unter der An- leitung von Herrn Prof.Dr.G.Schenck im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität und im Hauptlaboratorium der Schering A.G. Berlin mit der Abfassung der vor - liegenden Dissertation.